REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA

VOLUME 4 ABRIL, 1944 NÚMERO 1

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DOS "ARCTIIDAE". II. (Lepidoptera, Heterocera) [1]

LAURO TRAVASSOS

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 30 figuras no texto)

Ernassa Walker, 1856

Ernassa Walker, 1856, v. 7, p. 1643.
Elysius Kirby, 1892, p. 219, p. p.
Ernassa Kirby, 1892, p. 525 (tipo *jurtina* — *Limacodidae*).
Automolis Hampson, 1901, p. 39, p. p., *nec* Huebner, 1819, p. 170.
Automolis Hampson, 1920, p. 129, p. p.
Ernassa Hampson, 1920, p. 129 (tipo *sanguinolenta*).
Automolis Seitz, 1921, p. 365, p. p.

Cabeça com palpos de segmento distal muito reduzido, voltados dorsalmente e não atingindo o nível do vértice. Tromba bem desenvolvida. Antenas com segmentos com duas longas apófises nos dois sexos. Asas anteriores largas, subtriangulares, mais arredondadas nas fêmeas. Asas posteriores com a margem anterior fortemente convexa. Nervulação — Asa anterior : Sc terminando antes de R^1 ; R^1 tendo origem perto da extremidade distal da célula ; R^2 adiante da célula ; R^3 terminando adiante do ápice da asa ; R^4 no ápice ; R^5 depois do ápice ; M^1 partindo do ângulo anterior da célula ; M^2 e M^3 do ângulo posterior ; Cub^1 de perto do ângulo ; Cub^2 de pouco adiante do meio da célula ; A terminando no *tornus ;* disco celular com duas flexões e formando ângulo agudo com o tronco radial. Asa posterior : Sc com tronco comum ao radial e dele se afastando antes do meio da célula e terminando na margem anterior da asa, depois da discocelular ; R^1+n terminando adiante do ápice da asa ; M^1+n terminando no ápice ; Cub^1 tendo origem pouco abaixo do ângulo posterior da célula ; Cub^2 no início do terço distal da célula ; A^1 terminando adiante do *tornus* ; A^2 depois do *tornus*. Genitália — 10.º tergito de estrutura peculiar, apresentando uma forma sub-piramidal, com a extremidade distal alongada e dirigida para a face ventral, com a ponta em forma de gancho. A porção proximal, larga, apresenta uma formação ampla guarnecida de pêlos lamelares e, frequentemente, dois esporões agudos dirigidos dorsalmente. 10.º esternito não esclerosado. 9.º segmento com tergito largo, menos quitinisado que o 10.º ; esternito delgado e em arco, sem formar *saccus*. *Valvae* complexas e constituídas por 3 partes : uma basal, larga e forte, e duas distais, sendo a dorsal alongada e forte, de forma irregular, e a ventral, lamelar, situada logo abaixo da primeira e guarnecida de longos pêlos. Falosoma simples, com *vesica* guarnecida de pequenos espinhos. *Juxta* simples e anular.

Espécie tipo : *Ernassa justina* (Cramer, 1782) Walker, 1856.

[1] Recebido para publicação a 25 de Novembro de 1943.

Êste gênero foi estabelecido por WALKER em 1856 para *justina,* uma das espécies incluídas por HUEBNER no gênero *Automolis.* HAMPSON considera *justina* idêntica à *sanguinolenta* Cramer, passando a considerar esta última como tipo de *Ernassa,* que acredita sinônimo de *Automolis.*

São incluídas atualmente no gênero *Ernassa* três espécies muito homogêneas, a saber : *justina* (Cramer, 1782), *sanguinolenta* (Cramer, 1782) e *ignata* n. sp. Estas espécies constituem um gênero bem definido pela curiosa estrutura do 10.º tergito e pela nervulação da asa posterior.

Tivemos oportunidade de examinar três exemplares de espécies dêste gênero, pertencentes ao Museu Nacional e provenientes da região amazônica. Um dos exemplares masculinos corresponde exatamente à figura de STOLL para *justina* ; os outros dois representam um casal que corresponde à figura de CRAMER para *sanguinolenta.* O exame das genitálias dos machos mostrou serem espécies distintas.

Vários exemplares de uma espécie próxima, capturados em Angra dos Reis, no Estado do Rio, e de coloração intermediária, constituem a terceira espécie que incluimos neste gênero, com o nome de *E. ignata* n. sp. As três espécies, não obstante a acentuada semelhança exterior, são fàcilmente distinguíveis pelas características da genitália.

Ernassa justina (Cramer, 1782) Walker, 1856
(Figs. 1-10)

Bombyx justina Cramer, 1782, p. 186, est. 383, fig. E.
Bombyx justina Stoll, 1790, p. 95, est. 19, figs. 4 F-H.
Automolis jurtina Huebner, 1819, p. 170.
Ernassa justina Walker, 1856, v. 7, p. 1643.
Ernassa jurtina Kirby, 1892, p. 525.
Automolis sanguinolenta Hampson, 1901, p. 44, fig. 39, p. p.
Automolis sanguinolenta Rothschild, 1910, p. 22, ? p. p.
Automolis sanguinolenta Rothschild, 1922, p. 472.

Macho — Côr geral laranja, salpicado de vermelho (mais ou menos 196 do código de Seguy). Cabeça : Fronte e vértice côr de laranja, salpicado de escamas vermelhas. Palpos curtos, com o segmento distal muito curto ; são voltados para a face dorsal, não atingem o nível do vértice e teem a mesma coloração da fronte. Tromba pequena, de côr parda. Antenas com os primeiros segmentos revestidos de escamas vermelhas e os restantes sem escamas e de côr parda, tendo a extremidade dorsal da fuste branca. Artículos antenais apresentando cada um duas apófises que aumentam da base até o primeiro quinto, para se manterem do mesmo comprimento até o terço distal, donde diminuem progressivamente até o penúltimo segmento distal.

Tórax : Face dorsal uniformemente laranja, incluídas a patágia e a tégula. Pleuras côr de laranja um tanto róseo. Pernas anteriores da côr das pleuras. Tíbia anterior com longas escamas na extremidade distal e uma estria parda na face externa que se estende até o primeiro segmento tarsal ; epífise com metade do comprimento total da tíbia. Pernas médias e posteriores de côr uniforme. A tíbia média apresenta um par de espinhos apicais e a posterior dois pares, sendo um apical e outro sub-terminal.

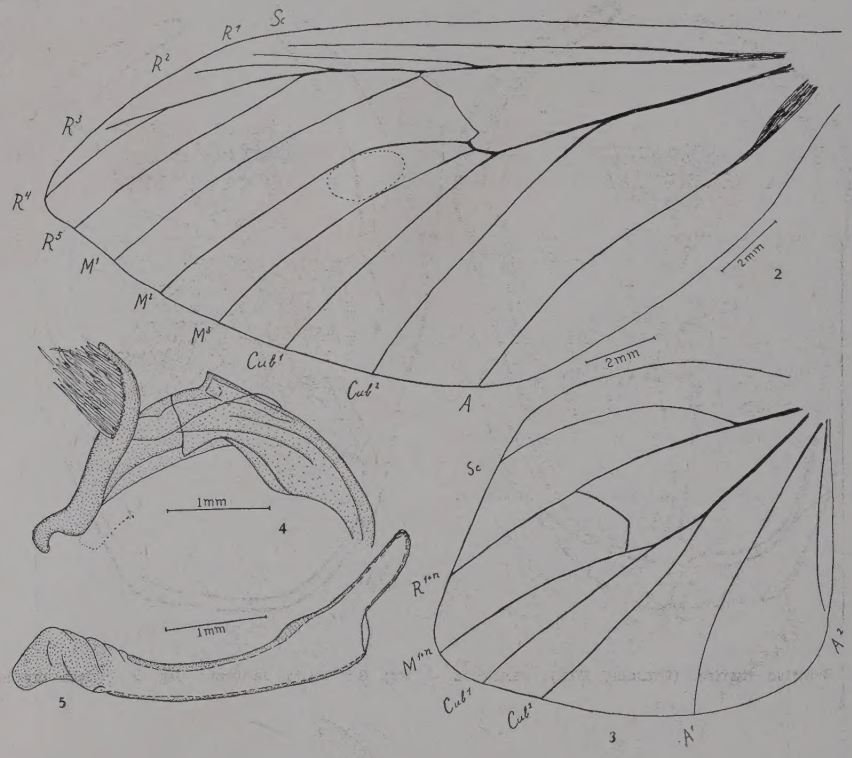
Asas: Anterior com a face superior laranja, salpicada de escamas vermelhas, e com desenhos fugases de linhas vermelhas margeadas de pardo. A costa e as nervuras são pardas. As linhas vermelhas limitam uma figura sub-quadrangular, situada obliquamente da extremidade anterior da célula à metade proximal da margem posterior da asa. A asa anterior apresenta uma característica mancha branco puro, elipsóide, ocupando toda a largura do espaço entre M^2 e M^3, situada pouco adiante da célula. A face inferior é de coloração uniforme, ligeiramente mais intensa que a superior e com a reprodução da mancha elipsóide branca. Asa posterior com a margem anterior muito convexa, quase formando ângulo, de maneira a dar à asa contôrno quase quadrangular; é de coloração laranja mais carregada nas margens, em ambas as faces.

Fig. 1 — *Ernassa justina* (Cramer, 1782), macho

Asa anterior medindo 21 mm. por 10 mm. (relação 2,1); asa posterior com 11 mm. por 10 mm. (relação 1,1).

Nervulação: Asa anterior: Sc terminando antes de R^1; R^1 nascendo na célula, próximo do ângulo anterior; R^2 se destacando do tronco, antes de R^5 e terminando adiante do ápice da asa; R^3 terminando antes do ápice; R^4 no ápice; R^5 atrás do ápice; M^1 tendo origem no ângulo anterior da célula; M^2 e M^3 no ângulo posterior; Cub^1 quase no ângulo; Cub^2 tendo origem pouco adiante do meio da célula; A terminando no *tornus;* discocelular com duas flexões, formando com o tronco radial ângulo de cerca de 45°. Asa posterior: Sc destacando-se do tronco radial no fim do terço proximal da célula; R^1+^n terminando antes do ápice da asa; M^1+^n no ápice; Cub^1 tendo origem perto

do ângulo posterior da célula ; Cub^2 pouco adiante do meio ; A^1 e A^2 terminando adiante do *tornus ;* discocelular com uma flexão de abertura externa e formando com o tronco radial ângulo de 45°.



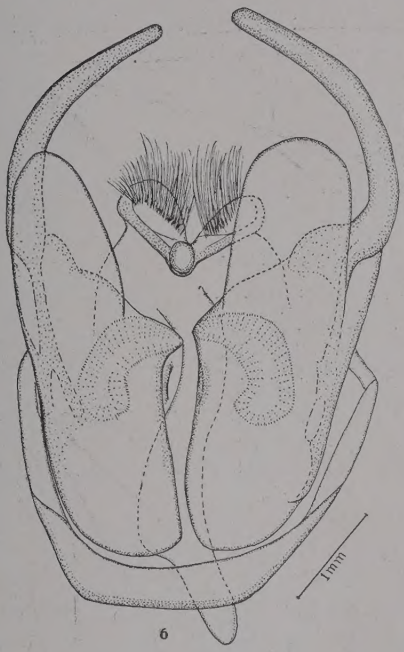
Ernassa justina (Cramer, 1782) — Fig. 2 : Nervulação da asa anterior ; fig. 3 : nervulação da asa posterior ; fig. 4 : 9.º e 10.º tergitos, vista lateral ; fig. 5 : falosoma.

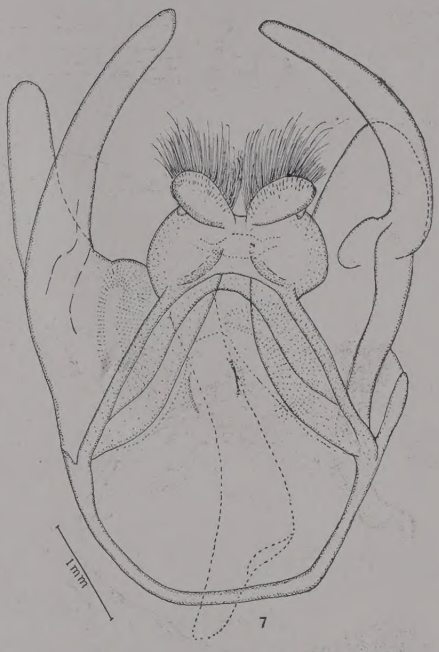
Abdômen : De coloração uniforme, laranja intenso.

Genitália : 10.º tergito de forma característica, constituido por uma porção distal delgada, dirigida ventralmente, e terminando em ponta unciforme ; a parte basal é larga e fortemente quitinizada, com duas formações auriculares simétricas e providas de longos pêlos lamelares negros, que apresentam aspectos diversos quando vistos dorsal ou lateralmente (figs. 6 e 8). A ligação entre o 10.º e o 9.º tergitos é pouco quitinizada, de modo a ficar o 10.º tergito como um apêndice. 10.º esternito não esclerosado. 9.º segmento com o tergito saliente e largo e o esternito delgado, formando um estreito arco ventral, sem *saccus*. *Valvae* complexas, constituidas por uma parte proximal, larga e forte, tendo internamente uma formação falciforme, pilosa, característica (fig. 9) ; distalmente apresentam um prolongamento dorsal, forte e rijo, cujas extremidades convergem para o eixo do corpo ; êste prolongamento é mais ou menos arredondado e guarnecido de pêlos longos. Abaixo desta formação existe uma outra, semilunar, flácida, guarnecida de longos pêlos dispostos em leque. Falosoma simples, com *vesica* guarnecida de pequenos espinhos. *Juxta* muito pouco quitinisada.

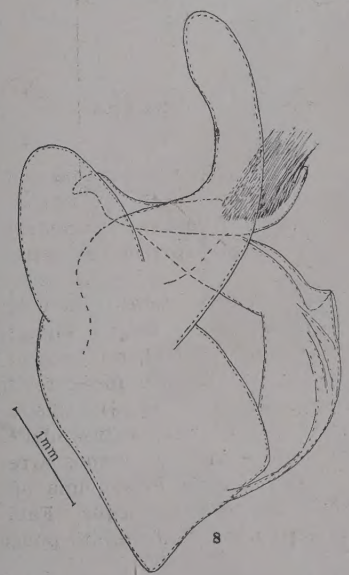
Fêmea desconhecida.

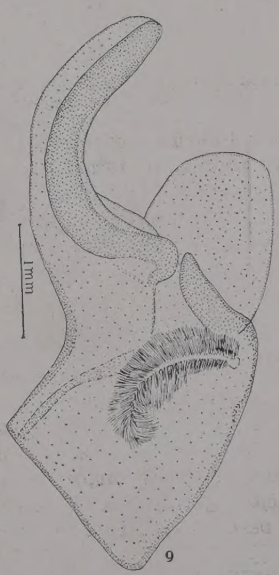
Distribuição geográfica — Inicialmente descrita do Surinam; foi confundida com *E. sanguinolenta*, referida para a Guiana Inglesa, Perú e Brasil (Amazonas).





Ernassa justina (Cramer, 1782), genitália — Fig. 6: Vista ventral; fig. 7: vista dorsal.





Ernassa justina (Cramer, 1782) — Fig. 8: Genitália, vista lateral; fig. 9: *valva*, vista interna; fig. 10: detalhe do 10.º tergito.

Examinamos um exemplar proveniente de Utinga, Estado do Pará, que corresponde exatamente à figura de STOLL. Os exemplares tipo de CRAMER e de STOLL foram perdidos; assim tomamos como *neo-typus* o exemplar que estudamos: *Neo-typus*: N.º 60.025, Utinga, Estado do Pará, A. M. Moss, Museu Nacional, Rio de Janeiro.

As larvas desta espécie foram criadas por STOLL em folhas de "papaia".

Ernassa sanguinolenta (Cramer, 1782) Hampson, 1920
(Figs. 11-19)

Bombyx sanguinolenta Cramer, 1782, v. 3, p. 102, est. 252 A.
Elysius sanguinolenta Kirby, 1892, p. 219.
Automolis sanguinolenta Hampson, 1901, p. 44, fig. 39 p. p.
Automolis sanguinolenta Rothschild, 1910, p. 22, ? p. p.
Ernassa sanguinolenta Hampson, 1920, p. 129, p. p.
Automolis sanguinolenta Seitz, 1921, p. 365, est. 51 E.
Automolis sanguinolenta justina Seitz, 1921, p. 371.
Automolis sanguinolenta Rothschild, 1922, p. 472, ? p. p.

Macho — Côr geral laranja forte (167 do código de Seguy). Cabeça: Laranja, com salpicos de escamas pardas. Palpos curtos e voltados para a face dorsal, sem atingir o nivel do vértice; teem o segmento distal muito reduzido.

Fig. 11 — *Ernassa sanguinolenta* (Cramer, 1782), macho.

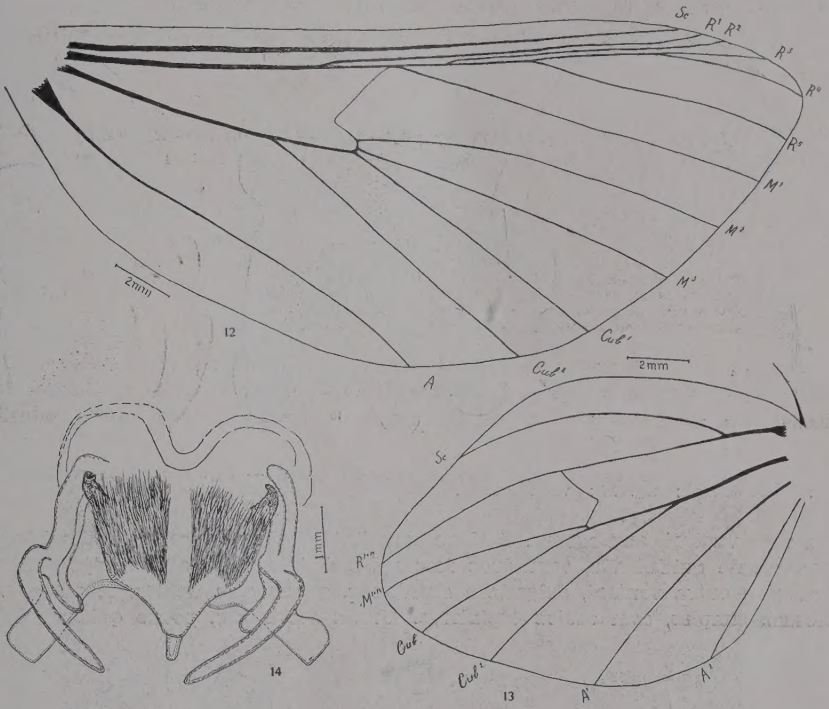
Antenas com os três segmentos proximais revestidos de escamas vermelhas e os restantes sem escamas e de côr parda, tendo a face dorsal da extremidade da fuste branca. Os segmentos antenais apresentam duas apófises que aumentam de comprimento no terço basal, para diminuirem progressivamente no terço distal, até o penúltimo segmento.

Torax: Face dorsal com a coloração geral; pleuras e pernas igualmente. Tíbia anterior com longas escamas na extremidade distal.

Asas: Da côr geral; a face superior com a metade basal da costa e as nervuras pardas. Franja parda. Na área entre Cub^2 e A existem duas manchas laranja claro; adiante de A existem outras duas. Uma nítida mancha branca, elipsóide, ocupando toda a largura da área entre M^2 e M^3, fica situada logo adiante da célula. A face inferior tem a coloração da superior, porém a costa é parda em toda a extensão. Asa posterior com a margem anterior muito

convexa, de maneira a dar um contorno sub-quadrado; a coloração é idêntica à da asa anterior, porém mais clara, por ser menos escamosa.

Asa anterior medindo 25 mm. por 11 mm. (relação 2,27); asa posterior com 14 mm. por 11 mm. (relação 1,36).



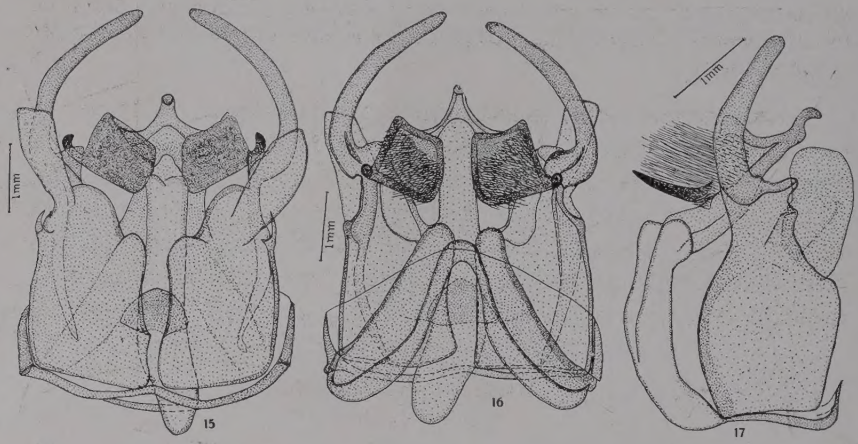
Ernassa sanguinolenta (Cramer, 1782), macho — Fig. 12: Nervulação da asa anterior; fig. 13: nervulação da asa posterior; fig. 14: genitália, vista posterior.

Nervulação: Asa anterior: Sc terminando antes da primeira radial; R^1 nascendo perto da extremidade distal da célula; R^2 antes de R^5 e terminando adiante do ápice da asa; R^3 terminando adiante do ápice da asa; R^4 no ápice; R^5 depois do ápice; M^1 partindo do ângulo anterior da célula; M^2, M^3 e Cub^1 partindo do ângulo anterior da célula; Cub^2 partindo do início do quarto distal da célula; A terminando no *tornus*; discocelular com uma flexão em ângulo reto e formando ângulo de 45° com o tronco radial. Asa posterior: Sc se afastando do tronco radial no fim do terço proximal da célula; R^{1+n} terminando antes do ápice; M^{1+n} partindo do ângulo posterior da célula e terminando no ápice da asa; Cub^1 partindo do ângulo da célula; Cub^2 do início do terço distal; A^1 terminando adiante do *tornus*; A^2 também antes do *tornus*.

Abdômen: De côr uniforme e igual à do torax.

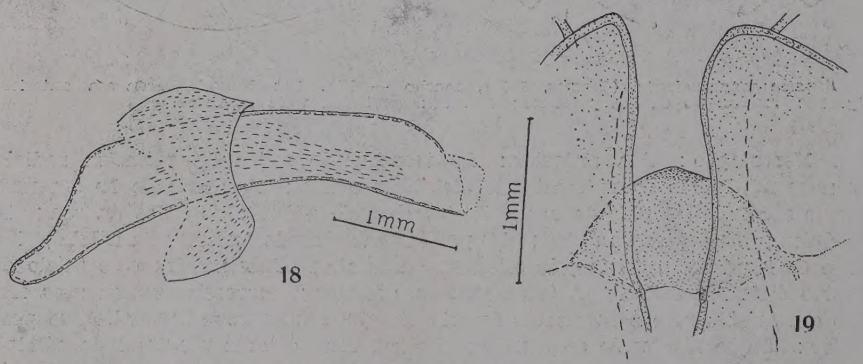
Genitália: 10.º tergito característico, constituido por um segmento distal, delgado, dirigido ventralmente e terminado por uma ponta unciforme; a porção proximal é larga, sub-quadrangular, fortemente esclerosada, apresentando dorsalmente duas áreas quadradas providas de longos e fortes pêlos lamelares,

negros, e tendo, cada uma, no ângulo externo, uma forte apófise cônica muito quitinisada (fig. 15). Quando visto posteriormente o 10.º tergito apresenta aspecto comparavel a uma testa de touro (fig. 17). 10.º esternito não esclerosado. 9.º segmento com tergito largo, saliente dorsalmente, separado do 10.º por uma porção pouco quitinisada; o 9.º esternito é muito delgado e forma



Ernassa sanguinolenta (Cramer, 1782), genitália do macho — Fig. 15: Vista ventral; fig. 16: vista dorsal; fig. 17: vista lateral.

um arco ventral, sem *saccus*. *Valvae* constituidas por um setor proximal largo, fortemente quitinisado, com duas formações distais, uma dorsal, rija e digitiforme, e outra ventral, delgada e semilunar, guarnecida de longos pêlos. Falosoma simples, com *vesica* espinhosa. *Juxta* semilunar, pouco quitinisada.



Ernassa sanguinolenta (Cramer, 1782), macho — Fig. 18: Falosoma e *juxta;* fig. 19: *juxta*, vista ventral.

Fêmea — Com a coloração geral do macho. Cabeça semelhante, porém as antenas com as apófises bem menores. Asas com os mesmos desenhos e coloração, mas de contorno mais arredondado; as posteriores teem coloração mais uniforme. A mancha branca situada na asa anterior, entre M^2 e M^3, é relativamente menor, não ocupando toda a largura da área. A superfície superior da asa anterior é mais fortemente salpicada de pardo. A asa anterior mede 30 mm. por 15 mm. (relação 2); asa posterior com 15 mm. por 11 mm. (relação 1,36).

Nervulação como no macho. As tíbias das pernas anteriores teem uma estria parda que se estende até abaixo do meio do primeiro segmento tarsal. Os 2.º e 3.º pares com coloração uniforme. O abdômen, no exemplar examinado, perdeu muitas escamas, mas parece não apresentar diferença de coloração com o do macho.

Distribuição geográfica. — Descrita inicialmente do Surinam; posteriormente assinalada na Guiana Inglesa, Perú e Brasil (Amazonas). Como foi confundida com *E. justina*, estas outras proveniências podem se referir a uma ou a outra espécie.

Examinamos desta espécie um casal da coleção do Museu Nacional, que corresponde exatamente à figura de CRAMER. Como os exemplares tipo de CRAMER se perderam, consideramos os que foram aqui descritos como *neo-typus* de *E. sanguinolenta*: *Neo-tipus*: N.º 60.023, *ignotus*, Boy, VI-925, macho; n.º 60.103, Obidos, Estado do Pará, fêmea. O exemplar n.º 60.023 não refere a proveniência, mas foi capturado por BOY, que colecionou no vale do Amazonas.

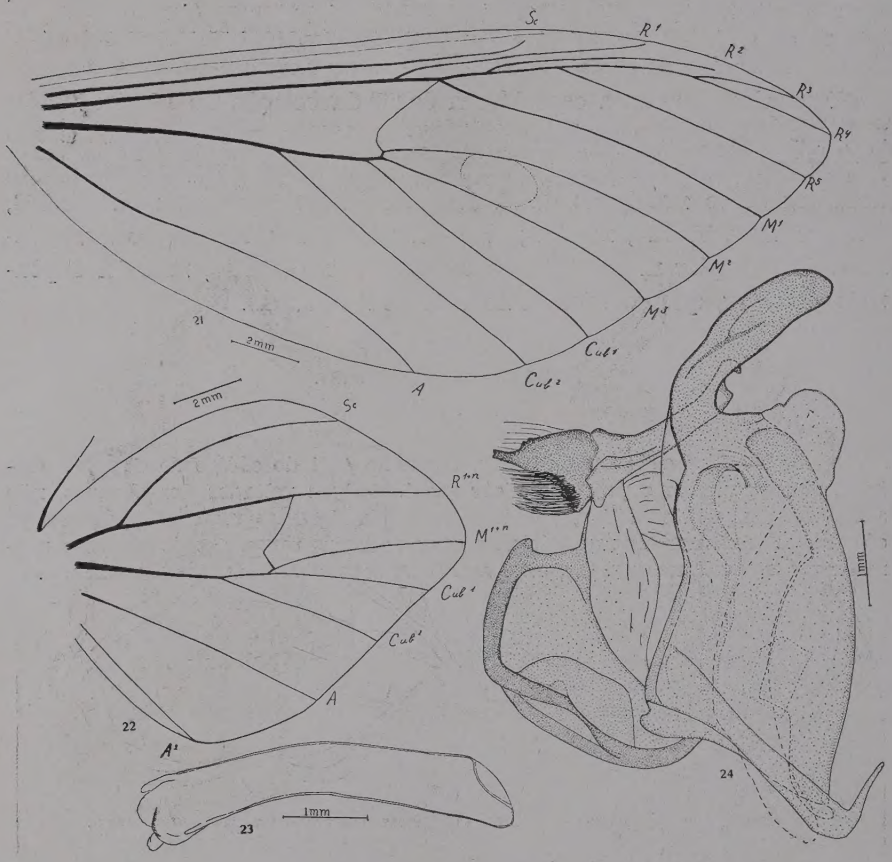
Ernassa ignata n. sp.
(Figs. 20-30)

Macho — Coloração geral laranja vermelho (181 do código de Seguy). Cabeça, fronte, vértice e palpos, da côr geral. Palpos voltados dorsalmente, não atingindo o nivel do vértice, e com artículo distal muito reduzido. Tromba de côr parda. Antenas com os três primeiros artículos revestidos de escamas vermelhas e os restantes pardos, com a extremidade dorsal da fuste branca. Ar-

Fig. 20 — *Ernassa ignata* n. sp., macho.

tículos antenais com duas apófises, que aumentam progressivamente até o fim do primeiro terço, diminuindo no terço distal.

Torax: Com a face dorsal de coloração uniforme, bem como as pleuras e as pernas. Tíbias anteriores com longas escamas na extremidade distal e com a epífise tendo metade do comprimento total. Tíbias médias com um par de espinhos apicais e tíbias posteriores com um par terminal e outro sub-terminal.

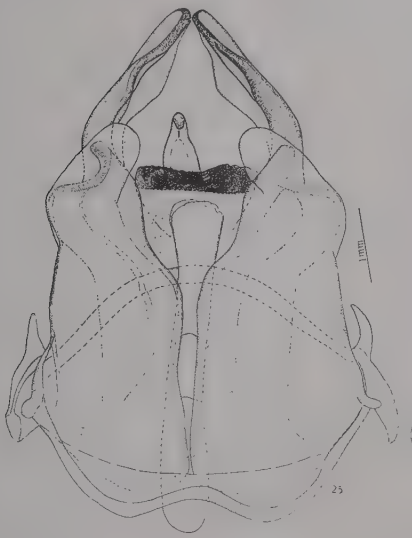


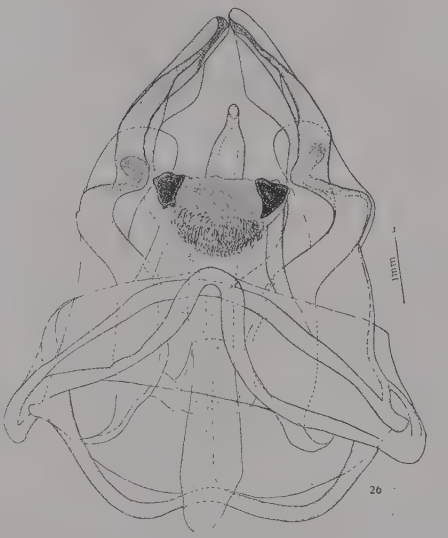
Ernassa ignata n. sp. — Fig. 21: Nervulação da asa anterior; fig. 22: nervulação da asa posterior; fig. 23: falosoma; fig. 24: genitália, vista lateral.

Asas: Anterior com a face superior laranja vermelho, salpicado de escamas pardas, e com um retângulo, formado por linhas de escamas vermelhas margeadas de pardo, situado obliquamente da extremidade anterior da célula à margem interna da asa; estas linhas são pouco nítidas e um tanto difusas. A metade proximal da costa é parda, assim como as nervuras. Uma mancha elipsóide, branca, situada adiante da célula, ocupa toda a largura da área entre M^2 e M^3. Face inferior com a mesma coloração da superior e com a costa parda em toda a extensão. Asa posterior com a margem anterior fortemente convexa, sub-quadrangular, e com a coloração, de ambas as faces, laranja vermelho.

Asa anterior medindo 25 mm. por 10 mm. (relação 2,5); asa posterior com 12 mm. por 10 mm. (relação 1,2).

Nervulação: Asa anterior: Sc terminando antes de R^1; R^1 nascendo na extremidade distal da célula, pouco distante do ângulo posterior; R^2 nascendo atrás de R^5 e terminando adiante do ápice da asa; R^3 terminando adiante do ápice; R^4 no ápice; R^5 atrás do ápice; M^1 nascendo no ângulo posterior da célula; M^2 e M^3 no ângulo posterior; Cub^1 muito perto do ângulo; Cub^2 no início do terço distal da célula; A terminando no *tornus*; discocelular com uma curva na porção posterior e formando ângulo de cerca de 45° com o tronco radial. Asa posterior: Sc afastando-se do tronco radial no fim do terço proximal da célula; R^1+n terminando antes do ápice; M^1+n partindo do ângulo posterior da célula e terminando no ápice; Cub^1 partindo de perto do ângulo posterior; Cub^2 tendo início no terço distal da célula; A^1 terminando adiante do *tornus*; A^2 no *tornus*.



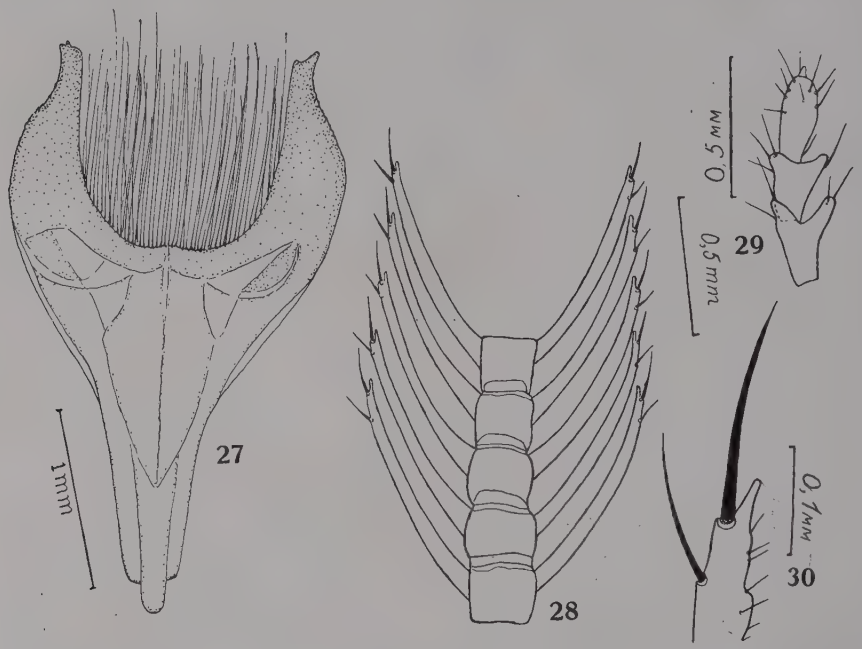


Ernassa ignata n. sp., genitália — Fig. 25: Vista ventral; fig. 26: vista dorsal.

Abdômen: Com coloração geral uniforme.

Genitália: 10.° tergito fortemente esclerosado e com prolongamento distal delgado, dirigido ventralmente, e terminando em ponta unciforme. A porção proximal é larga, sub-triangular, e apresenta nos ângulos laterais duas saliências piramidais, de base triangular e de contornos pouco regulares, com ápice irregularmente obtuso. Atrás destas saliências existe uma área semilunar provida de longos e fortes pêlos lamelares pretos. Quando visto por trás o 10.° tergito apresenta uma configuração que lembra a testa de um touro (fig. 27). 10.° esternito não esclerosado. 9.° segmento com tergito giboso e muito desenvolvido, que é separado do 10.° tergito por uma porção pouco quitinisada e profundamente escavada (fig. 24). 9.° esternito delgado e sinuoso na face ventral, sem formar *saccus*. *Valvae* constituidas por uma parte proximal larga e fortemente quitinisada; na porção distal apresentam um forte prolongamento

dorsal, digitiforme, de contornos irregulares e ligeiramente inclinados para baixo e para dentro, com longos pêlos. Na parte ventral há um prolongamento del-



Ernassa ignata n. sp. — Fig. 27 : 10.º esternito, vista posterior : fig. 28 : segmentos médios da antena ; fig. 29 : segmentos terminais da antena ; fig. 30 : detalhe da terminação das apófises das antenas.

gado e mais ou menos semilunar, provido de longos pêlos dispostos em leque. Falosoma simples, com *vesica* provida de pequenos espinhos. *Juxta* pouco quitinisada e de contorno semilunar, quando vista ventralmente.

Fêmea — Desconhecida.

Proveniência — Angra dos Reis, Estado do Rio, Brasil.

Typus — Na coleção do Instituto Oswaldo Cruz, sob o n.º 11.321.

Desta espécie examinamos os seguintes exemplares : N.º 11.321, Angra dos Reis, Japuiba, 8-931, Travassos col. ; n.º 12.758, Angra, Jussaral, 4-934, Travassos, Almeida & Penido col. ; n.º 12.921, Angra, Jussaral, 8-934, Travassos & Oiticica col. ; n.º 13.686, Angra, Jussaral, Travassos, Oiticica & Mendes col.

E. ignata n. sp. é bastante rara e muito semelhante às outras duas incluídas no gênero *Ernassa*, delas se distinguindo pelas asas mais lançadas, pelo colorido intermediário e pelas características da genitália, principalmente pelo 10.º tergito.

Todos os exemplares foram capturados à luz elétrica ; um na altitude de 20 metros e três na de 250 metros ; chegam à luz nas primeiras horas da noite, antes da obscuridade completa.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):13-26
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

SÔBRE A INFLUÊNCIA DO LÓBO ANTERIOR DA HIPÓFISE NO PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRAL [1]

JOSÉ RIBEIRO DO VALLE
Instituto Butantan, São Paulo

(Com 11 figuras no texto)

Introdução

A influência das glândulas de secreção interna, sobretudo do lóbo anterior da hipófise, no processo de ossificação endocondral, é de comprovação experimental relativamente recente. Os estudos dos autores holandeses Freud, Levie & Kroon (4), dando o disco epifisário como o local de ação do hormônio de crescimento, foram logo seguidos e ampliados pelo grupo de Evans, na Califórnia. Ray, Evans & Becks, empregando ratos de diferentes idade, estudaram as consequências da hipofisectomia e do tratamento com preparações muito puras de hormônio de crescimento, quer sôbre o disco epifisário proximal da tíbia (12), quer sôbre as articulações condrocostais (13). Freud & Levie (3), preconizando a mensuração da cauda de ratos para a avaliação das preparações somatotrópicas, trataram das alterações histológicas ao nível das vértebras.

A parada do crescimento esquelético dos animais hipofisoprivos, conforme se sabe hoje, é a resultante de profundas alterações metafisárias descritas já em 1937, no cão e no rato, por Sammartino (14). As condições experimentais de obtenção e correção hormonal destas alterações têm grande interêsse, não sòmente para o melhor conhecimento das propriedades do hormônio de crescimento, como, principalmente, para a compreensão do seu mecanismo de ação quer nos animais de laboratório quer no homem, conforme já tivemos oportunidade de referir (16) também em colaboração com os nossos companheiros da Seção de Endocrinologia dêste Instituto (7).

---

[1] Recebido para publicação a 22 de Dezembro de 1943.
Trabalho da Seção de Endocrinologia do Instituto Butantan.

No presente trabalho, usando o rato jovem e adulto como animal de experiência, estudaremos a influência do lóbo anterior da hipófise no processo de ossificação intracartilaginosa, mormente no que se refere às consequências da hipofisectomia e do tratamento com extratos alcalinos préhipofisários. Para a revisão da histofisiologia do osso, além dos trabalhos já citados e do que vem descrito no livro de MAXIMOV & BLOOM (9), o leitor poderá consultar o recente artigo de MCLEAN (10).

Para melhor compreensão do processo de ossificação endocondral, ao nível dos ossos longos, vamos descrever resumidamente o que se passa no modelo cartilaginoso da tíbia do rato e que pode servir de exemplo do que ocorre noutros mamíferos, inclusive o homem.

O modêlo tibial, originário do blastema mesenquimal, consta de cartilagem hialina revestida de pericôndrio formado de uma camada externa fibrosa e de outra interna, responsavel pelo crescimento aposicional da cartilagem, e que mais tarde virá a ser a camada osteogênica periostal, ativa por sua vez no crescimento aposicional do osso. Com o crescimento intersticial da cartilagem, aparece, no centro da futura diáfise, uma zona de hipertrofia e multiplicação celulares com formação de lacunas, cujas paredes se calcificam com a penetração de elementos vasculares e osteogênicos provindos da camada profunda do pericôndrio-periósteo. Além dêste centro de ossificação diafisário formam-se os centros de ossificação das extremidades e que serão as futuras epífises proximal e distal. As lâminas interlacunares, nestes centros de ossificação, e que surgem por causa da diminuição da matrix cartilaginosa, depois de calcificadas, são revestidas pelos osteoblastos originando-se as primeiras espículas ósseas. Destas resultam as trabéculas que se orientam para as epífises, deixando cavidades nos antigos centros de ossificação. As cavidades reunidas formarão a medula óssea contendo elementos conjuntivos mesenquimais, inclusive os hemocitoblastos. A destruição do tecido esponjoso trabecular recenconstruido, formando a cavidade medular, seria a consequência da atividade osteoclástica que também se manifesta ao nível do cilindro periostal. É facil compreender que, separando as cavidades medulares dos três centros de ossificação, existem duas zonas cartilaginosas mantendo o crescimento longitudinal do osso. Elas formam os discos epifisários, proximal e distal, chamados ainda linhas de ossificação. Diz-se que o osso se alonga com o afastamento destas linhas epifisárias, que, uma vez soldadas, impedem o crescimento longitudinal ulterior do osso. É interessante assinalar que, no rato, a extremidade distal da tíbia se solda na 12.ª semana de vida enquanto que a extremidade proximal permanece aberta durante quase toda a existência (2). Portanto, nesta espécie, o crescimento longitudinal é sempre possivel; aliás, é sabido que os ratos crescem num ritmo rápido até o 5.º mês e depois, lentamente, durante toda a vida.

Nos ratinhos de 15 dias de idade a epífise mostra uma zona central de *medulização* cercada de cartilagem cujas células, em direção à diáfise, se dispõem em fileiras radiadas. Estas células são a princípio colunares, achatadas, depois vesiculosas. Em seguida a estas células globosas, sempre em direção à medula diafisária, vem a zona de remoção cartilaginosa ou zona de erosão, constituida de alças capilares entre numerosas trabéculas longitudinais finas, revestidas de

osteoblastos. Na periferia, onde o disco reune a cartilagem de conjugação ao cilindro ósseo, como numa coluna o fuste ao capitel, as trabéculas já são mais espessas e irregulares com estrias basófilas e osteoblastos aprisionados.

A zona de erosão integra, para alguns autores, a chamada metáfise de grande importância na resistência do osso à pressão e à tração.

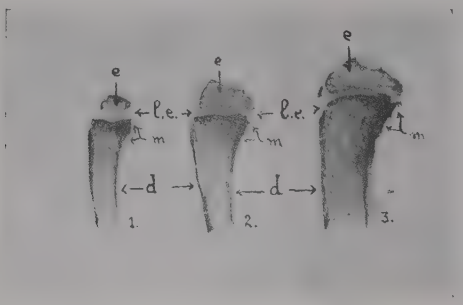


Fig. 1. — Cortes longitudinais de tíbias de ratas de diferentes idades: 1. 15 dias; 2. 1 mês; 3. 2 meses de idade, fixados em formol e tratados com nitrato de prata (*liné test*) (2 x aprox.) e. — epífise; l.e. — linha ou disco epifisário; m. — metáfise, incluindo a esponjosa primária dos histologistas; d. — cilindro ósseo diafisário contendo a medula óssea.

Temos, então, a *epífise* com o seu centro de ossificaçao e a sua cartilagem de proliferação, a *metáfise,* incluindo a zona esponjosa primária dos histologistas e, finalmente, a *diáfise* com a sua medula e o cilindro ósseo de formação periostal aposicional (figs. 1 e 2). O disco cartilaginoso epifisário da extremi-

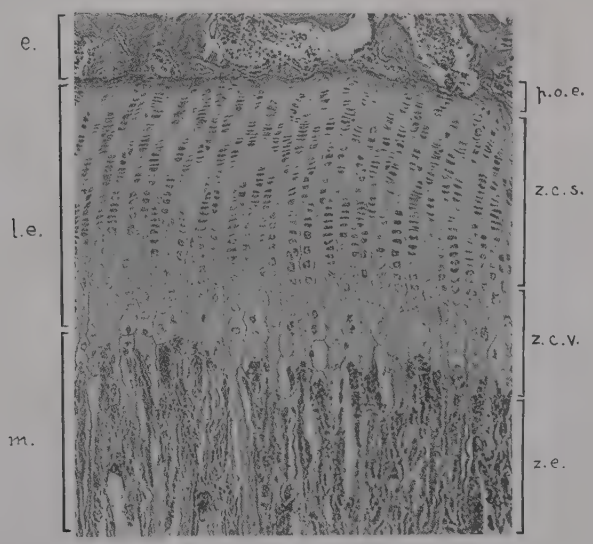


Fig. 2. — Corte longitudinal da linha epifisária proximal da tíbia de um rato normal de 38 dias de idade (Hem.Eos. 100 x) e. — epífise; l.e. — linha epifisária; m. — metáfise; p.o.e — placa óssea epifisária; z.c.s. — zona de células seriadas; z.c.v. — zona de células vesiculosas; z.e. — zona de erosão com as alças capilares e as trabéculas ósseas longitudinais.

dade proximal da tíbia de ratinhos de 15 dias, na porção central, mede cerca de 0.5 mm. de espessura. Nos ratos de um mês de idade já aparece uma placa óssea separando a epífise do disco cartilaginoso. Há maior congestão da zona de erosão e maior condensação trabecular. A espessura central do disco é de 0.4 a 0.6 mm. (fig. 3). Depois do segundo mês esta espessura começa a dimi-

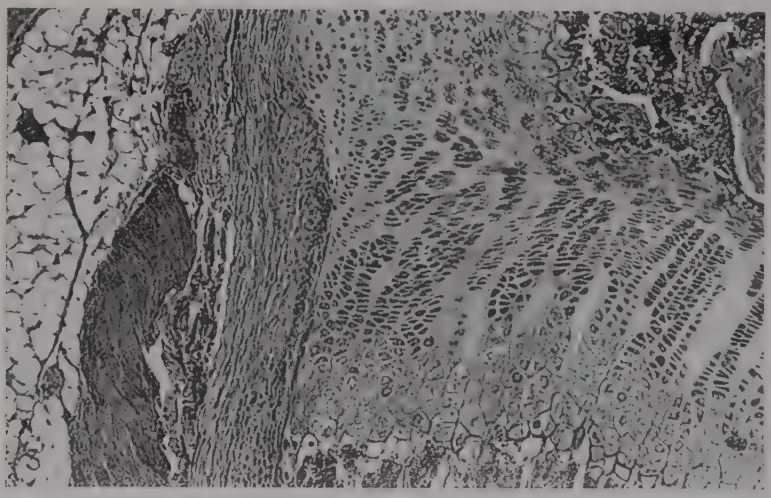


Fig. 3. — Corte longitudinal da extremidade proximal da tíbia de uma rata de 1 mês de idade (H.Eos. 100 x). Observar a espessura do disco ao nível da junção epífiso-metafisária.

nuir, chegando, em média, a 0.2 mm. no 5.º mês de vida. Com a idade diminue também a condensação trabecular, à medida que aumentam a irregularidade da linha e a *medulização* (figs. 4 e 5). Nos ratos velhos as trabéculas ósseas são raras e curtas formando-se uma placa óssea incompleta do lado diafisário

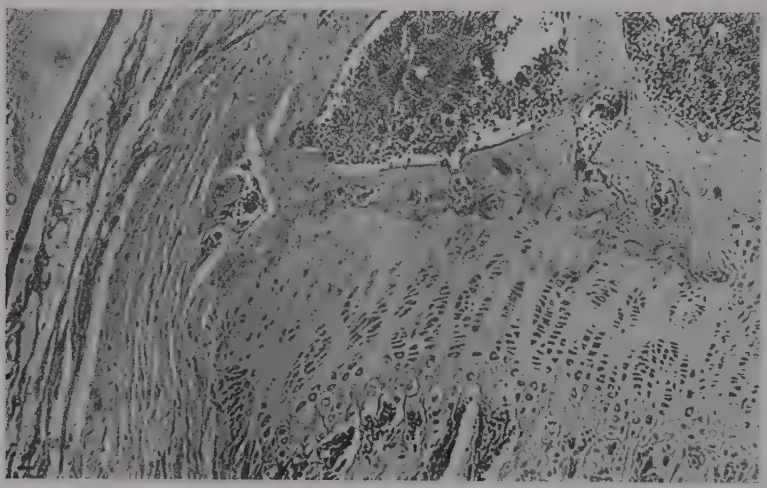


Fig. 4. — Rata de 4 meses de idade. Mesma região e mesmo aumento da figura anterior.

como a enclausurar o disco já bastante estreitado pela redução numérica das células seriadas e vesiculosas. Depois do exposto convem referir desde já que a influência do lóbo anterior da hipófise no processo de ossificação intracartilaginosa depende da idade do animal. Os efeitos da hipofisectomia e das injeções de hormônio de crescimento estão na dependência do ritmo de crescimento, isto é, da intensidade de ossificação no momento experimental.

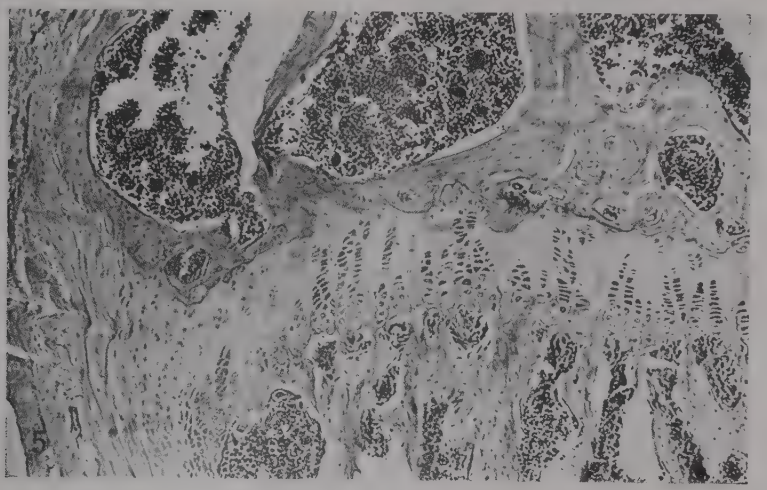


Fig. 5. — Rata de 6 meses de idade. Mesma região e mesmo aumento das figuras 3 e 4. Observar o aumento da cavidade medular epifisária, a redução da espessura do disco e o enclausuramento das células vesiculosas pela placa óssea diafisária em formação.

Material e Métodos

Empregamos na feitura do núcleo do presente trabalho 20 ratas jovens de 2 a 3 meses de idade, hipofisectomizadas pela via parafaríngea [2], e 21 ratas adultas de 174 a 235 g. de peso. As ratas jovens, operadas, foram repartidas em 4 grupos (Quadro I): *a*) hipofisoprivas sem tratamento; *b*) hipofisoprivas tratadas com hormônio de crescimento; *c*) hipofisoprivas tratadas com preparação inativa; e, finalmente, *d*) ratas hipofisectomizadas parcialmente, não tratadas.

As ratas adultas normais foram repartidas em dois grupos de dois lotes cada e serviram para o ensaio das preparações utilizadas (HC3c e HC3b). A atividade dos extratos alcalinos de lóbos anteriores de hipófises bovinas foi deduzida da comparação do crescimento ponderal e do comprimento da cauda nos dois lotes de cada grupo. As injeções eram feitas diariamente, por via subcutânea, durando 10 dias o tratamento (Quadro II).

Nas ratas hipofisoprivas, em geral, o tratamento principiava no 15.º dia depois da operação, uma injeção diária subcutânea durante 10 dias, sendo os animais sacrificados 24 horas depois da última dose.

---

[2] Agradecemos aqui ao Dr. Virgilio C. Foglia, do Instituto de Fisiologia de Buenos Aires, os esclarecimentos técnicos prestados quando estivemos na Argentina em 1941.

QUADRO I

Condições experimentais das ratas jovens hipofisectomizadas

CONDIÇÕES E GRUPOS	N.º	DIAS DE OPERAÇÃO	PESO CORPORAL em g			COMPRIMENTO DA CAUDA em mm			PESO DOS ORGÃOS em mg				
			Inicial	Final	Dif.	Inicial	Final	Dif.	Utero	Ovarics e trompas	Adrenais	Tiropara-tiroides	Restos de hipófises
A: Hipofisectomia total	1	25	130	126	— 4	149	149	0	92	42	15	13	—
	2	26	115	118	+ 3	139	140	+ 1	86	31	17	10	—
	3	29	110	107	— 3	131	132	+ 1	71	42	15	10	—
a. Sem tratamento	4	25	106	90	— 16	154	160	+ 6	62	22	12	8	—
	Média	26	113	108	— 5	147	148	+ 1	70	34	14	10	—
b. Tratamento com a preparação HC3c. (ativa)	6	22	118	126	+ 8	150	158	+ 8	65	31	15	12	—
	7	26	91	109	+ 18	153	155	+ 2	40	26	12	12	—
	8	25	112	130	+ 18	165	166	+ 1	58	32	13	10	—
	Média	24	107	122	+ 15	156	160	+ 4	56	30	13	11	—
c. Tratamento com a preparação HC3b. (inativa)	9	20	130	103	— 27	159	167	+ 8	41	37	12	9	—
	10	20	112	92	— 20	169	168	— 1	33	19	12	12	—
	11	24	113	108	— 5	156	160	+ 4	67	38	12	8	—
	12	26	107	112	+ 4	155	155	0	60	33	12	11	—
	Média	23	118	104	— 14	160	163	+ 3	50	32	12	10	—
B: Hipofisectomia parcial	13	18	99	117	+ 18	155	165	+ 10	290	65	37	18	6
	14	23	105	114	+ 9	165	168	+ 3	145	48	32	18	4
	15	20	116	130	+ 14	167	170	+ 3	140	53	26	16	2
d. Sem tratamento	16	21	119	127	+ 8	152	165	+ 13	251	84	38	15	3
	17	24	96	130	+ 34	160	167	+ 7	200	80	42	21	3
	18	24	102	129	+ 27	155	161	+ 6	282	74	48	18	2
	19	22	101	130	+ 29	157	158	+ 1	311	77	52	27	5
	20	25	95	106	+ 11	157	160	+ 3	168	50	28	15	2
	Média	22	104	123	+ 19	159	164	+ 5	223	66	38	19	3

QUADRO II

Resposta de Ratas adultas ao tratamento com extratos alcalinos de lóbos anteriores bovinos

GRUPOS		N.º DE ANIMAIS	TRATAMENTO (10×0.5c.)	PESO CORPORAL MÉDIO EM G			COMP. MÉDIO DA CAUDA EM MM		
				Inicial	Final	Difer.	Inicial	Final	Difer.
A.	*a*) Contr.	5	Sôro fisiológico	235	236	+ 1	190	191	+ 1
	b) Exper.	5	HC3c (Ativa)	216	238	+ 22	183	188	+ 5
B.	*a*) Contr.	6	Sôro fisiológico	174	175	+ 1	179	181	+ 2
	b) Exper.	5	HC3b (Inativa)	175	176	+ 1	183	185	+ 2

Além dos grupos experimentais mencionados, foi usado um grande número de ratos de diferentes idades e de ambos os sexos, para o estudo da ossificação normal, o ensaio das diferentes técnicas e a influência dietética [3].

No fim da experiência os animais eram sacrificados, pesadas as principais glândulas endócrinas e dissecada a pata direita que era fixada em Bouin, incluída em parafina, após descalcificação suficiente no ácido nítrico, para cortes de 6 a 8 micra, corados pela hematoxilina-eosina. Foram tomados os devidos cuidados para a obtenção, tanto quanto possível na porção central do osso, de cortes longitudinais ântero-posteriores da extremidade proximal da tíbia e metade da diáfise. Os cortes da junção condrocostal foram obtidos da 3.ª ou 4.ª costelas de qualquer dos lados.

Em muitos casos, para melhor estudo da calcificação trabecular, fizemos o *line-test* na pata esquerda dissecada e fixada durante 24 horas no formol. Corte mediano longitudinal lavado em água e mergulhado durante 2 minutos numa solução de nitrato de prata a 2% em vidro escuro; nova lavagem em água e exposição à luz, em placa de Petri, durante alguns minutos.

Os ossos de ratos infantís, e até ao 3.º mês de vida, são facilmente cortados com lâminas de barbear, antes mesmo da descalcificação. Depois do 3.º mês a resistência do osso aumenta com a idade, daí ser preciso prolongar o tempo de permanência no ácido. Em alguns casos, no preparo dos cortes da tíbia, usamos o método de Gomorri conforme a descrição de Ingalls (5). Dada a dificuldade atual na obtenção da celoidina, deixamos de experimentar o processo recomendavel de McLean & Bloom (11).

A pesada dos animais foi sempre feita em jejum e para medir a cauda usamos uma táboa de 30x15 cm. com uma régua e dois pequenos suportes metáli-

[3] Não é preciso acentuar a importância da alimentação no estudo da ossificação normal. As dietas raquitogênicas, por exemplo, baseadas no desequilíbrio cálcio-fósforo, modificam profundamente o disco epifisário. Na nossa colônia de ratos albinos (BAW), alimentada com pão, leite, aveia e amendoim e em boas condições gerais e reprodutivas, encontrávamos com frequência, no início destes estudos, animais de 2 a 3 meses de idade apresentando espessamento irregular da linha epifisária e lesões da esponjosa primária lembrando o raquitismo frusto. Houve normalização da linha e da metáfise depois do emprego sistemático, não do óleo de cação, que vinha sendo usado irregularmente, mas do *Navitol Squibb*, diluido em óleo de amendoim e misturado á seguinte dieta adicional: fubá 67%, farinha de alfafa 10%, farinha de carne 10%, caseina 5%, óleo vitaminado 5% e cloreto de sódio 3%.

cos separados o suficiente para passagem da cauda e sem prejudicar a posição das patas do animal colocado em decúbito dorsal. A rata era levada de encontro aos suportes de apoio da bacia, a cauda distendida e a leitura feita diretamente na régua.

Resultados

1. *Ratas jovens hipofisectomizadas.* Quando a extirpação da hipófise é completa o crescimento para, embora se possa registrar em alguns animais, entre o começo e o fim da experiência, pequeno aumento ponderal. De regra, porém, quando as ratas não são tratadas com preparações ativas, o peso se mantém ou mesmo cai. Registramos, no nosso grupo de ratas tratadas com preparação inativa, *deficit* até de 27 g. em 20 dias (rata N.º 9). O exame da curva ponderal fornece pois elementos para se julgar do êxito operatório e da eficiência do tratamento. Na hipofisectomia parcial, depois do choque cirúrgico, o animal retoma o crescimento na dependência da atividade funcional da restante adenohipófise. Também a diferença no comprimento da cauda, entre o começo e o final da experiência, constitue outro critério de avaliação do sucesso da operação ou da eficiência da preparação ministrada (Quadro I). Pode acontecer, em alguns casos, que o aumento caudal à mensuração decorra do emagrecimento do animal e não do alongamento vertebral; isto constitue, às vezes, uma causa de erro que precisa ser devidamente considerada.

Quando se examina, nos cortes histológicos, a extremidade tibial ou a articulação condrocostal das ratas hipofisectomizadas observam-se alterações que se acentuam com o tempo de hipofisectomia. A espessura do disco epifisário tibial, nas ratas hipofisoprivas de 25 dias por exemplo, sofre grande redução. Os valores encontrados foram de 0.15 a 0.20 mm. que são os registrados para ratas adultas normais além do 5.º mês de vida. Como se pode ver muito bem na figura 6, forma-se do lado diafisário uma placa óssea enclusurando as células vesiculosas. É como se o animal tivesse envelhecido em curto prazo, ficando a linha epifisária *selada* entre duas lâminas de oso, a diafisária recenformada e a proximal datando do 1.º mês de vida. Além da lâmina distal desaparecem quase totalmente as trabéculas longitudinais e o seu revestimento osteoblástico ; elas são substituídas por infiltrado celular sem as alças capilares metafisárias do osso normal. O crescimento do osso para necessariamente, uma vez interrompidas a proliferação das células seriadas e a erosão metafisária, por desaparecimento da esponjosa primária.

Com o tratamento substitutivo ou na hipofisectomia parcial (fig. 7) o aspecto histológico da extremidade tibial é bem diverso. As trabéculas longitudinais avançam para o centro da diáfise revestidas de osteoblastos, que, retidos nas malhas, constituem os osteocitos. Não

há vestígio de placa óssea distal e os novelos capilares, na zona de erosão, entremeiam as células vesiculosas distais em seguimento das seriadas achatadas e numerosas.

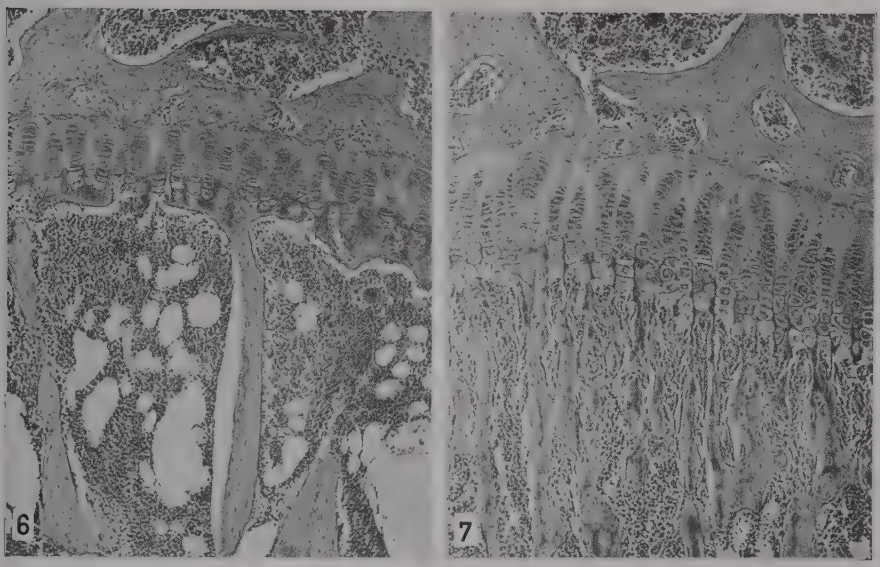


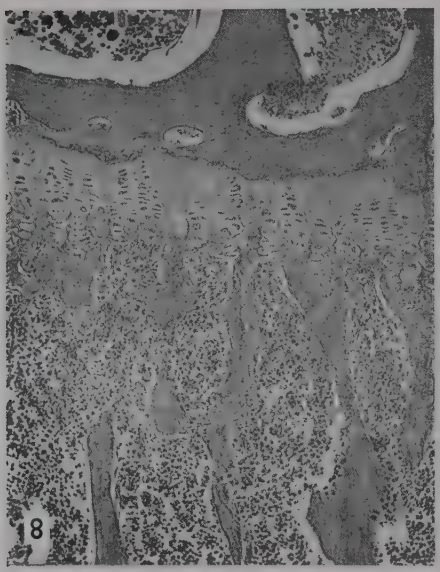
Fig. 6. — Linha epifisária da extremidade proximal da tíbia de uma rata de 3 meses de idade, hipofisopriva de 25 dias (H.Eos. 100 x). Fig. 7. — Linha epifisária da extremidade proximal da tíbia de uma rata de 3 meses de idade, hipofisectomizada parcialmente 25 dias antes (H.Eos. 100 x). Comparar com a figura anterior.

As mesmas observações podem ser feitas para a junção condrocostal : redução das células seriadas e vesiculares, rarefação trabecular e medulização excessiva nos animais sem hipófise ; aumento da espessura da linha, liberação das células vesiculosas e trabeculização diafisária nas hipofisectomizadas parciais ou nas tratadas com preparação ativa.

2. *Ratas adultas normais.* Nas ratas jovens, conforme acabamos de ver, a operação promove graves alterações do disco epifisário, em parte comparaveis ao que se observa fisiologicamente nos animais adultos que atingiram o *plateau* de crescimento. Nestes, a linha epifisária é estreita, medindo 0.13 mm. em média de espessura, e o número de células seriadas bem pequeno. As células vesiculosas, reduzidas no número e no tamanho aparecem enclausuradas em certas áreas, exatamente onde se forma a lâmina óssea diafisária. Há grande infiltração celular entre as raras trabéculas e a zona de erosão praticamente não existe (fig. 8).

Nas ratas adultas tratadas, a linha epifisária aumenta de espessura, medindo em média 0.25 mm. tanto à custa das células seriadas,

quanto das vesiculosas. Distinguem-se perfeitamente a zona de erosão e o aumento da trabeculização diafisária (fig. 9). As alterações ao nivel da articulação condrocostal podem ser apreciadas nas figuras 10 e 11.



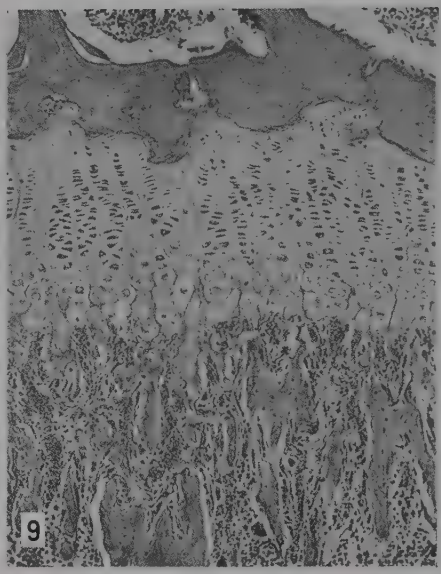


Fig. 8. — Linha epifisária proximal da tíbia de uma rata adulta testemunha, injetada durante 10 dias com 0.5cc. de solução fisiológica (H.Eos. 100 x). Fig. 9. — Rata adulta injetada durante 10 dias com 0.5cc. diários da preparação HC3c (extrato alcalino de hipófises bovinas). Mesma zona e mesmo aumento da figura 8. Notar o espessamento do disco epifisário e a reativação da osteogênese.

Com dosagem suficiente, além destas modificações histológicas, há aumento do peso do corpo e do comprimento da cauda (Quadro II).

As alterações histológicas ao nivel da extremidade proximal da tíbia, nas ratas jovens hipofisectomizadas ou nas adultas normais, podem ser observadas de modo mais grosseiro ao *line-test*. A prata depositada, sob a ação da luz, nas lâminas e nas traves ósseas, permite conclusões sôbre a espessura e a regularidade do disco cartilaginoso e o grau de trabeculização diafisária, que apoiam o que ficou descrito.

Comentários

A linha epifisária constitue senão o único pelo menos o mais importante local de ação do hormônio de crescimento. Freud e col. (4), por este motivo, preferem chamá-lo hormônio condrotrófico. Dizem eles que a influência da adenohipófise se faz sôbre o crescimento da cartilagem e não sôbre o desenvolvimento ósseo, e que. os ossos chatos, como os da face e da calota craniana, por não apresentarem o estágio

prévio cartilaginoso, não se distinguem se os doadores foram ou não hipofisoprivos, com ou sem tratamento. Esta limitação de conceito do hormônio de crescimento não parece entretanto vantajosa, uma vez que a fração condrotrópica conduz ao aumento ponderal e ao crescimento da cauda.

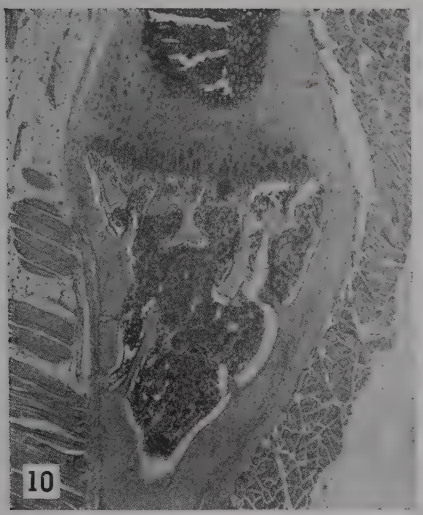


Fig. 10. — Articulação condrocostal da 3.ª costela de uma rata adulta tratada com sôro fisiológico (H.Eos. 100 x). Fig. 11. — Rata adulta tratada com HC3c. Mesma zona e mesmo aumento da fig. 10. A reativação da osteogênese, assinalada na fig. 9, pode ser também apreciada ao nível da articulação condrocostal.

É conhecido o debate entre as escolas de Evans e Riddle sobre a individualidade do hormônio de crescimento. Hoje, com a obtenção pelo grupo da Califórnia de preparações muito puras, praticamente isentas de outras frações prehipofisárias (8), a existência daquele hormônio parece firmada, embora a sua importância possa não ser necessariamente a mesma em todos os vertebrados.

Ingalls & Hayes (6) descreveram alterações do disco epifisário tibial do rato, depois da adrenalectomia, comparaveis às observadas nos hipofisoprivos. Seria então o hormônio adrenotrópico do lobo anterior, através do hormônio da cortex suprarrenal, o mediador na regulação prehipofisária da ossificação endocondral? A pergunta pode ser respondida comprovando primeiro se as lesões do disco epifisário são realmente comparaveis na adrenalectomia e na hipofisectomia, e depois se as alterações descritas nos hipofisoprivos são corrigidas pelo hormônio cortical. Já fizemos experiências neste sentido e que serão minuciosa e oportunamente relatadas. No rato de um mês de idade, adrenoprivo, e com sobrevida média de 10 dias depois da operação, não obtivemos as

alterações epifisometafisárias descritas para os hipofisoprivos. Também não observamos normalização do disco dos animais sem hipófise tratados com extratos corticais ou com acetato de desoxicorticosterona.

Além disso, a preparação empregada — HC3c ativa sôbre a linha epifisária (figs. 9 e 11) e sôbre a curva ponderal dos animais tratados (Quadros I e II), não aumentou o peso das adrenais, nem das tiroparatiróides e dos ovários.

É fora de dúvida, por conseguinte, que o controle da ossificação intracartilaginosa pelo lóbo anterior da hipófise se faça por intermédio de uma fração diferente pelo menos da adrenotrópica, da tirotrópica e da gonadotrópica.

Segundo SAMMARTINO (14), com a hipofisectomia não há somente parada da ossificação endocondral mas também sinais involutivos ao nivel da metáfise. Para este autor a alteração mais grave reside na involução e no desaparecimento das alças capilares da esponjosa primária e na consequente falta de erosão das células vesiculosas. A resultante é a formação da placa óssea diafisária como que selando o disco. Para o grupo de LAQUEUR, uma vez completo o fechamento da linha, o animal não mais responde ao hormônio de crescimento, daí a necessidade de se iniciar o tratamento logo depois da hipofisectomia. O grupo de EVANS dá menor importância a este fato iniciando as injeções mesmo 15 dias depois da operação. Os nossos animais responderam ao tratamento iniciado dentro deste período.

BECKS e col. (1) assinalam que 4 dias depois da hipofisectomia, numerosos osteoclastos aparecem de permeio às trabéculas ósseas, abaixo da cartilagem epifisária, iniciando assim o processo de absorção delas. Já no 4.º dia de tratamento, e com doses hormonais insuficientes para o crescimento do rato, é possivel, segundo os mesmos autores, por em evidência a ação do hormônio de crescimento sôbre o disco epifisário.

Dado o pequeno número de animais tratados com a preparação ativa e em condições experimentais comparaveis, os grupos *a* e *d* (Quadro I) fornecem melhores elementos para a análise da influência da hipófise sôbre o crescimento ponderal e o alongamento da cauda. É facil verificar, também no Quadro I, a grande variação nos valores da mensuração da cauda, daí a vantagem em se associar os três critérios na avaliação das preparações somatotrópicas : a curva ponderal, o crescimento da cauda e a histologia da linha epifisária. Já tivemos ocasião de comentar a importância prática do assunto na verificação de atividade dos produtos farmacêuticos como o extrato pré-hipofisário *Squibb* e o Antuitrin C de *Parke Davis*. Somente em alguns casos, poude ser notada certa atividade destas preparações empregando-se a prova histológica (7).

Não cabe aquí referir a influência dos diferentes fatores que intervêm na ossificação normal, por exemplo o papel da fosfatase na preci-

pitação dos sais de cálcio ao nivel das trabéculas e a importância do parathormônio na utilização deste elemento. Quando dizemos que ao nivel da zona esponjosa há constante absorção e reconstrução ósseas, não sabemos qual o processo regulador da atividade osteoclástica e osteoblástica. Por outro lado, conforme SELYE (15), nos primeiros dias de vida do rato, o tecido ósseo tem grande autonomia de desenvolvimento ; mesmo depois da ablação da epífise, do femur por exemplo, os centros reguladores próprios do osso podem reconstituí-la e formar nova linha de ossificação cartilaginosa.

O estudo da influência das glândulas endócrinas, mormente do lóbo anterior da hipófise sôbre a ossificação intracartilaginosa, vem colocar em novas bases o problema do desenvolvimento esquelético. O tecido ósseo, e não poderia deixar de ser assim, entra deste modo para o âmbito da regulação química hormonal, de tamanha importância noutros setores da economia.

CONCLUSÕES

1. O processo de ossificação endocondral depende da regulação endócrina, exercida principalmente pelo lóbo anterior da hipófise por intermédio do hormônio de crescimento, cuja existência parece indiscutivel.

2. O hormônio de crescimento prehipofisário age sôbre os discos cartilaginosos dos ossos longos e das articulações condrocostais e corrige as graves alterações neles observadas depois da hipofisectomia.

3. Nas ratas jovens hipofisoprivas ou nas adultas normais, sob a influência do tratamento com extrato alcalino de lóbos anteriores de hipófises bovinas, aumenta a espessura do disco epifisário e reorganizam-se as trabéculas ósseas longitudinais.

4. Três critérios podem ser seguidos na avaliação de atividade das preparações de hormônio de crescimento : a curva ponderal, o alongamento da cauda e as condições histológicas do disco epifisário. O segundo critério é o menos seguro e o último o mais sensivel.

SUMMARY

The rôle of the hypophysis on the endochondral ossification has been emphasized by the north-american (EVANS et al.) ande the dutch (FREUD et al.) authors who presented many important data for a better understanding of the site and the mode of action of the growth hormone.

After a revision of the process of intracartilaginous ossification, we have also studied in the rat the influence of hypophysectomy and treatment with alkaline extracts of beef anterior pituitary. Three criteria are now available for the assay of the growth preparations either with adult or with juvenile, hypophysectomized female rats: bodily weight, length of the tail and the histological condition of the epiphyseal plate. The latter was found the most sensitive and the length of the tail the least accurate.

After complete hypophysectomy, regressive alterations were observed at the epiphyseal line : numerical reduction of the cartilage cells with a narrowing of the disk and disapperance of the metaphyseal capillary loops and of the bony trabeculae which were substituted by a bony plate at the diaphyseal side. Under

the action of an active growth preparation the normal ossification was promptly reassumed : increased width of the cartilage, liberation of the vesicular cells by new capillary loops and longitudinal reorganization of the trabeculae after resorption of the diaphyseal plate. The alkaline extract used provoked also a stimulation of the diaphyseal disk and chondrocostal junctions of normal adult female rats ; an *younger* type of the tibial plate was obtained when compared with that of controls receiving only physiological solution.

The hormonal regulation of the bone development appears to be exerted mainly through a specific factor of the pituitary gland — the growth promoting substance, which existence seems today unquestionable.

BIBLIOGRAFIA

1. BECKS, H., KIBRICK, E. A., MARX, W. & EVANS, H. M., 1942. The early effect of hypophysectomy and of immediate growth-hormone therapy on endochrondral bone formation. *Growth*, 5 : 449-456 (*in Chem. Abst.*, 36(11) : 3244).
2. DOODS, G. S. & CAMERON, H. C., 1943, Studies on experimental rickets in rats. *Amer. J. Anat.* 55:135-167.
3. FREUD, J. & LEVIE, L. H., 1939. Hypophyse und Schwanzwachstum der Ratte. Ein test fur Wachstumhormon. *Arch. Int. Pharm. Ther.*, 59:232-241.
4. FREUD, J., LEVIE, L. H. & KROON, 1939, Observations on growth (chondrotrophic) hormone and localization of its point of attack. *J. Endocrinol.*, 1(1) : 56-66.
5. INGALLS, T. H., 1941, Epiphyseal growth : normal sequence of events at the epiphyseal plate. *Endocrinology*, 29(5) : 710-720.
6. INGALLS, T. H. & HAYES, D. R., 1941, Epiphyseal growth : the effect of removal of the adrenal and pituitary glands on the epiphyses of growing rats. *Endocrinology*, 29(5) : 720-725.
7. LOBO, J. I., VALLE, J. R., DÉCOURT, L & PORTO, A., 1943, Observações clínicas e experimentais com o hormônio de crescimento. *O Hospital*, 23(5) : 693-712.
8. MARX, W., SIMPSON, M. E. & EVANS, H. M., 1943, Purification of the growth of the anterior pituitary. *J. Biol. Chem.*, 143: 77-89.
9. MAXIMOV, A. A. & BLOOM, W., 1939, *A textbook of Histology*. W. B. Saunders, Philadelphia, 3.ª ed.
10. MCLEAN, F. C., 1943. Physiology of Bone. *Ann. Rev. Physiol.*, 5: 79-104.
11. MCLEAN, F. C. & BLOOM, W., 1940, Calcification and ossification. Calcification in normal growing bone. *Anat. Rec.*, 78(3) : 333-361.
12. RAY, R. D., EVANS, H. M. & BECKS, H., 1941, Effect of the pituitary growth hormone on the epiphyseal disk of the tibia of the rat. *Amer. J. Path.*, 17(4) : 509-529.
13. RAY, R. D., EVANS, H. M. & BECKS, H., 1942, The effect of growth hormone injections on the costochondral junction of the rat rib. *Anat. Rec.* 82(1) : 67-73.
14. SAMMARTINO, R., 1938, *Estudio histológico del proceso de osificación en animales hipofisoprivos*. Tese. Buenos Aires, 79 pp.
15. SELYE, H., 1934, On the mechanism controling the growth in length of the long bones. *J. Anat.*, 58(3) 290-292.
16. VALLE, J. R., 1942, A influência da hipofisectomia em ratos no processo de ossificação endocondral. *Com. Soc. Biol.*, São Paulo, 8 nov. 1942.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):27-48
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

THE PROPHYLACTIC AND CURATIVE ACTION OF SULFADIAZINE (2-SULFANILAMIDE-PYRIMIDINE), SULFAPYRIDINE (2-SULFANILAMIDE-PYRIDINE) AND SULFANILAMIDE (P. AMINOBENZO-SULFONAMIDE) ON THE ERYTHRO AND EXO-ERYTHROCYTIC CYCLES OF "PLASMODIUM GALLINACEUM" (THERAPEUTIC AND PARASITOLOGICAL ASPECTS) [1]

S. AMERICANO FREIRE and W. LOBATO PARAENSE

Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, Minas Gerais

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F

(With 3 text-figures)

The control of malaria by means of drugs has proved to be inefficient due to two deficiencies inherent to the anti-malarial drugs at present known—quinine, atabrine and plasmochin. In the first place these drugs do not always clear up the infection completly and secondly, they do not prevent the evolution of malaria after the bite of an infected mosquito. Their only action when administered before the mosquito bite is to supress temporarily the clinical manifestations. These three anti-malarial drugs contain in their structure the quinoline group seeing that the acridine nucleus of atabrine can also be considered as a derivative of quinoline and, up to the present, research for new anti-malarial drugs revolved almost entirely round the derivatives of 8-amino-quinoline. The discovery of the anti-malarial action of sulfanilamide and of some of its derivatives and of the derivatives of the sulfona group, has brought about a change in the orientation of research on the sinthetic anti-malarial drugs. COGGESHALL (2) found that a 1 gram dose of sulfanilamide taken by the mouth sterilises the acute infection produced in rhesus by inoculation with blood infected by the virulent *P. knowlesi* — the proof of this being the fact that the animal can be re-infected with the same sample of *P. knowlesi*. In man sulfa-

[1] Received for publication January 3, 1944.
Read at a meeting of the Brazilian Society of Biology, Minas Gerais branch, on 26th October, 1943.

nilamide has proved to be inferior to the anti-malarial drugs already known (3) (4) (5). In a canary infected by *P.cathemerium* and *P. lophurae* this drug was not effective even when in excessive doses (3). When sulfathiazol was given to general paralytics with malaria artificially induced, it produced a clinical cure, there being 5 relapses out of 9 cases treated. The anti-malarial action was slower than in the case of quinine. The initial dose was 3 grams followed by 1 gram every 4 hours up to a total of 25 or 30 grams. In a canary infected by *P.circumflexum* and *P.relictum* (variety *matutinum*) and by *P.nucleophilum,* sulfanilamide and sulfapyridine were employed but only the latter was effective against *P.circumflexum,* the action of sulfapyridine being inferior to that of quinine, atabrine and plasmochin (7). The intra-muscular or intraperitoneal dose employed was 0,02 grams — one-fifth of the minimum lethal dose.

Sulfadiazine (2-sulfanilamide-pyrimidine) was given in 13 cases of acute human malaria, naturally acquired, 7 infected by *P.vivax,* 5 by *P.falciparum* and 1 by *P.malariae.* The drug was given by the mouth, 6 grams the first day and 4 grams daily on the 5 days following, in fractions every four hours, and its action was energetic in all three types of human plasmodia. In 2 cases of patients with *P.vivax* and 1 with *P.falciparum* these doses were not sufficient to cure the infection (1). Only 1 of the patients showed toxic symptoms with fever which ceased as soon as the drug was suppressed.

Lately it has been shown that 4-4^{1}-diacetyl-diamine-diphenyl-sulphone is active against *P. cathemerium* in the canary and that in rhesus, in doses of 3 grams, it sterilised the malaria produced by the inoculation of blood infected by *P.knowlesi.* This action is equal to that of sulfanilamide and much greater than the protection given by quinine and atabrine (1). One of its derivatives the p-p^{1}-diamino-diphenil-sulphona-N-N-didextrose-sulphonate of sodium (Promin) which is less toxic, showed a definite action against human malaria naturally acquired. The infection by *P.vivax* proved to be less resistant to the action of this drug than infection by *P.falciparum* (1). Out of scores of derivatives of sulfonamide added to the diet in 1% doses, sulfadiazine was the only one which showed an action similar to that of quinine in malaria produced in a duck by inoculation of blood infected by *P.lophurae* (8). Promin given in doses of 2 grams daily for two days running via peritonium sterilised the malaria produced in rhesus by injection of blood infected with *P.knowlesi.* In the same condition 1 gram of Promin given for three days running was sufficient to sterilise malaria produced in rhesus by inoculation with blood infected by *P.cynomolgi.* As a prophylactic against inoculation by the sporozoites of *P.cynomolgi,* Promin in doses of 1 gram for two days running before inoculation showed itself not effective.

EXO-ERYTHROCYTIC CYCLE OF THE MALARIA PLASMODIA

In the domains of malariology the discovery which opened new horizons to therapeutic research and solved many clinical and epidemiological problems such as relapses, chronicity and quinine resistance, was the demonstration of a schizogonic cycles for the plasmodia of malaria which constitute the "endothelial stages" or "exoerythrocytic schizonts" (10).

Ever since James (11) showed that human malaria induced by injection of infected blood and that produced by injection of sporozoites gave a different response to quinine as regards efficacy and frequency of relapse, there has been an amplification of the theory of Grassi (12) that the sporozoite before penetrating the blood cell of the vertebrate host undergoes a cycle related to the period of incubation before becoming infective to the blood cell.

Raffaele (13) in 1934 verified in a canary with *P.elongatum* the existence of schizonts in the protoplasm of reticulo-endothelial cells of various organs. Since then exo-erythrocytic parasites have been observed in various species of plasmodia such as *P.gallinaceum, P.cathemerium, P.circumflexum, P.nucleophilum, P.vivax, P.falciparum, P.malariae* (14) and *P.juxtanucleare* (34).

The exo-erythrocytic schizonts are characterized by being non-pigmented as the reticulo-endothelial cells do not contain hemoglobin from which the pigment is formed.

While studying the evolution of the sporozoites of *P.gallinaceum* inoculated subcutaneously, Mudrow (15) and Paraense (16) observed that they develop at first outside the reticulo-endothelial cells producing mono and binuclear forms ; later, within the protoplasm of these cells they envolve producing multinuclear forms and completing the primary monogonic exo-erythrocytic phase from which arise the hemotropic merozoites which will produce the secondary monogonic erythrocytic phase. During the incubation period of *P.gallinaceum* which lasts from 4 to 6 days for blood inoculation, and from 6 to 10 days for sporozoit infection, the parasite develops at the site of inoculation no trace of blood infection having been observed either in the peripheral blood or in the blood of the various organs.

During the stage exo-erythrocytic forms already appear in the reticulo-endothelial cells of various organs such as the spleen, liver, bone marrow and chiefly in the cells of the endothelium of the brain capillaries. In the case of inoculation with sporozoites of *P.gallinaceum* exo-erythrocytic forms, although very rare, are seen in the capillaries of the brain after the 5th day of inoculation (17). The organ most frequently attacked varies with the species of plasmodium as does the frequency of exo-erythrocytic forms ; there may be differences among

different specimens of the same species (14). In human malaria these exo-erythrocytic forms have been met with in cases of specially severe infection. Paraense & Silva in 1941 (22) observed exo-erythrocytic forms in the brain, in a fatal case of human malaria produced by *P. falciparum*. In infection by *P.vivax, P.falciparum* and *P.malariae* external puncture has revealed the presence of exo-erythrocytic schizonts in the bone marrow.

Kikuth & Mudrow (9) believe that the frequency of exo-erythrocytic parasites varies with the pathogenic power of the plasmodium, that is, the presence of large numbers of these parasites in the reticulo-endothelial system makes the infection more serious.

THE ACTION OF ANTI-MALARIAL DRUGS ON EXO-ERYTHOCYTIC SCHIZONTS

The similarity of human and avian malaria, both as regards their reaction to anti-malarial drugs and from the biological standpoint, has caused avian malaria to be used as a field of research on the action of new therapeutic agents. Monkeys have less frequently been used for the same purpose. It had never been possible to eliminate completely by the use of quinine, atabrine and plasmoquine, all the malaria parasites in man, monkeys or birds. This is due to the existence of exo-erythrocytic schizonts on which these therapeutic agents have little or no action. Qninine does not prevent the death from exo-erythrocytic schizonts of chicks inoculated with *P.gallinaceum*. There is even a greater number of deaths of birds treated than of those not treated even after the cure of the erythrocytic cycle (11). In the same way quinine has no appreciable effect on this cycle in the case of *P.gallinaceum* (18) and of *P.relictum* (19).

In the case of infection by *P.cathemerium* produced by injection of an emulsion of the infected organ or of sporozoites, quinine and atabrine delay the appearence of exo-erythrocytic forms but have no appreciable effect on the number of such forms (20). Certune produces the same effect in a lesser degree and causes a slight reduction in the number of exo-erythrocytic schizonts. Plasmochin in still more active in delaying the appearance of exo-erythrocytic forms and of death and has also some slight action on the tissular phase. Only plasmochin seems to have any direct action on the exo-erythrocytic schizonts by reducing their number. If we consider that the cause of relapse in human malaria is the presence of exo-erythrocytic forms, this action of plasmochin may explain the small number of relapses after the use of this drug. As a prophylactic, its action only manifests itself in toxic doses (21). Plasmochin, atabrine, quinine and rhodoquine have no prophylactic action whether the infection is caused by

the inoculation of blood infected with *P.gallinaceum* or by sporozoites (23).

SINTON, HUTTON & SHUTE (33) showed that in patients bitten by mosquitoes infected with *P.falciparum*, proseptazine in doses of 9 grams given on the day before inoculation and continued till 8 hours after inoculation, prevents the appearance of parasites and of other symptoms of the disease. Of 5 patients thus treated only one had plasmodium in his blood 22 days after infection while in the controls the period of incubation was 11 days. It has been assumed that this action is exercised on the sporozoites.

THE ACTION OF SULFADIAZINE, SULFAPYRIDINE, SULFANILAMIDE, QUININE, PLASMOCHIN AND ATABRINE ON THE ERYTHRO AND EXO-ERYTHROCYTIC CYCLES OF "P.GALLINACEUM" IN CHICKS INOCULATED WITH INFECTED BLOOD

For the researches here mentioned, we chose *P.gallinaceum* because of its high pathogenic power, of the frequency of the exo-erythrocytic forms in the organs, chiefly in the brain, and also on account of the facility of acquiring the vertebrate host. We prefer chicks to adult fowls because the former are less resistant to the infection. All the chicks, two to ten days old, were Leghorns and were inoculated intramuscularly with infected blood.

The drugs used were in the solid state and were given by the mouth as bits of tabloids carefully weighed so as to control the dosage rigorously. As a rule they were only given in daily dose, less frequently in two daily doses ; this was done because the percentage of sulfanilamide in the blood is mantained for 6 to 8 hours after its administration (8). The minimum lethal dose was considered to be the single dose capable of killing a chick 24 to 48 hours after its administration.

From the 5th day after inoculation, the blood of all the chicks was examined daily and after the 21st day, search for exo-erythrocytic forms was carried out after the animal died or was killed. This search was made in impressions of the organs (brain, liver, spleen and bone marrow) or even in smears of these organs, in thin films stained with Giemsa's stain.

To show sterilization of chicks which had been inoculated and treated emulsions of half the brain, of liver in physiological serum or of 0,2 to 0,5 cc. of blood were injected separately or simultaneously into other chicks whose blood was in turn examined daily for 15 days from the fifth day onwards ; these chicks were subsequently killed for a direct search for exo-erythrocytic schizonts.

The reason for killing, 21 days after inoculation with blood, the chicks that received treatment was the observation that of 18 chicks used as controls 13 died with exo-erythrocytic forms in the brain, 13 to 22 days after inoculation and the other five died 8 to 12 days after inoculation although no exo-erythrocytic schizonts could be found, by direct search, in the capillaries of the brain. The later the period of death, the more abundant were the exo-erythrocytic forms. During the first few days of the infection, there was intense anemia due to the large number of blood cells infected ; this number may be as high as 85 to 90 per cent 8 to 12 days after infection. The mechanism of death during this period is possibly heart failure caused by the high percentage of potassium in the plasma. This takes place during the period of greatest sporulation which approximates that capable of causing toxic symptoms in mammalia (24). During

this period the percentage of hemoglobin may fall as low as 20 to 30 per cent while in normal chicks it is 100 to 110 per cent. At the end of the infection the erythrocytic forms are rare and the anemia less intense. The probable cause of death in this period is the poisoning of the cephalic centres by the presence of numerous parasites which sometimes seem to produce embolism of the capillaries (Table 1).

TABLE I

Table of results of therapeutic research on malaria produced by inoculation with infected blood

N.º of chicks	TREATMENT				BLOOD EXAMINATION	N.º of chicks with exo-Forms	STERILIZATION TEST			REMARKS
	Drug	Prophyl.	Curat.	Dose in mg			Blood	Brain	Result	
8	S. D.	+	—	33	4 with few gamet. on first 4 days 1 with gamet. during 9 days	0	3	3	0	
5	S. D.	+	—	21		0	0	0	0	
3	S. D.	+	—	16	2 with few gamet. and troph. during first few days	0	0	0	0	
2	S. D.	+	—	1,3	idem.	2	0	0	0	
2	S. D.	—	+	2x66	1 with persistence of gamet. during 5 days	0	0	0	0	
3	S. D.	—	+	66	3 with persistence of gamet. during 7 days	0	3	3	2	
15	S. D.	—	+	33	Persistence of gamet. 5 to 6 days or of gamet. and troph.	1	0	15	1	Brain, spleen and liver examined
3	S. P.	+	—	84	2 with gamet. 4 to 5 days	0	1	1	0	
1	S. P.	+	—	42	Gamet. and troph. during whole period of treatm.	0	1	1	1	
1	S. P.	—	+	42	idem.	1	0	0	0	
5	S.	—	+	30	2 with gamet. during whole period of treatment	0	0	2	0	
1	Q.	+	—	50		1	0	0	0	
2	Q.	—	+	30	Numerous troph. during treatment.	2	0	0	0	
2	A.	+	—	2,2		2	0	0	0	
4	A.	—	+	2,2	Numerous troph. from 3rd day	4	0	0	0	
2	P.	+	—	0,8	1 of them on the 18th day after inoculation showed troph. gamet. and schizonts in blood	1	0	0	0	
2	P.	—	+	0,8	1 with few troph. from 2nd day onwards	2	0	0	0	
13	0	0	0	0	Death 13 to 22 days after inoculation	13	0	0	0	Control
5	0	0	0	0	Death 8 to 12 days after inoculation	0	0	0	0	Control

S. D. Sulfadiazine
S. P. Sulfapyridine
S. Sulfanilamide
Q. Quinine
A. Atabrine
P. Plasmochin

SULFADIAZINE

The minimum lethal dose of sulfadiazine [2] could not be determined because the crop of the chicks could not hold more than 6 tabloids, or 3 grams of the drug; we can only say that the minimum lethal dose is larger than 3000 mg. /3000 g. The therapeutic index

$$\left(\text{Therapeutic index T.I.} = \frac{\text{minimum lethal dose M.L.D.}}{\text{Therapeutical dose T.D.}} \right)$$

[2] Lab. Abbott.

is greater than 90. When the infection was produced by the inoculation of blood, treatment was begun 24 hours after the inoculation or after the blood became positive and in both cases was continued till 21 days after inoculation. The first method we call prophylactic and the second curative.

We do not administer the drug before or at the time of the inoculation because, by its action on the merozoites of the inoculated blood, the drug would prevent the formation of exo-erythrocytic schizonts and the formation of the erythrocytic cycle.

Prophylactic treatment — 18 chicks received prophylactic treatment with sulfadiazine in doses varying from 13 to 33 milligrams given daily in single doses. Of these 18, eight received 33 milligrams and in the blood of 4 of them there were seen a few gametocytes which disappeared 4 days later. No schizonts were observed in the circulating blood. The blood and brain emulsion of 3 of these chicks were inoculated into 6 chicks whose blood remained negative during 21 days of observation and whose brains showed no sign of exo-erythrocytic schizonts. Five other chicks inoculated with infected blood received 21 milligrams of sulfadiazine ; one of them showed gametocytes in its blood during 9 days, and during the first few days there were a very few trophozoites but no schizonts. Direct search for exo-erythrocytic forms in the brain was negative. Of three others that received doses of 16 milligrams, gametocytes and trophozoites were found in the blood of two during the first few days but no schizonts. In none of these three chicks were exo-erytrocytic forms found in the cerebral capillaries. Two chicks received only 1,3 milligrams of sulfadiazine and trophozoites and gametocytes were observed, and in the brain of both exo-erythrocytic schizonts were found.

Curative treatment — Curative treatment was carried out in 20 chicks in doses varying from 33 to 132 mg. of sulfadiazine. This last mentioned dose was given to 2 chicks in two daily portions of 66 mg. at intervals of 8 hours. In one case the blood became negative, after 3 days for schizonts and 5 days for gametocytes, no exo-erythrocytic forms having been observed in a brain smear. In the other case the blood was negative for schizonts and trophozoites after 3 days of treatment while the gametocytes remained in the circulating blood for 9 days. Here also no exo-erythrocytic forms were found in the brain. In neither of these two cases were sterilization test made. In these two cases treatment was begun only 5 days after the blood became positive. A 66 mg. dose was given daily, in one dose, to 3 chicks whose blood was shown to be negative for schizonts and trophozoites after 5 days of treatment and positive for gametocytes during a period of 5 days. No exo-erythrocytic schizonts were found in any of the three chicks of this series but when the blood and the brain emulsion of each of these three were inoculated into two healty chicks parasites were found in the blood and the brain or brain blood of two. The curative dose of 33 mg. was given to 15 infected chicks whose blood became negative for trophozoites and schizonts after 2 or 3 days, and for gametocytes after 5 to 13 days of treatment. On examination of smear preparation of brain, liver, and spleen, only the liver of one of the chicks showed a young form of exo-erythrocytic schizont; the inoculation of the brain of this chick caused infection in another. The test for sterilization by inoculation of the emulsion of half the brain of each of the other 14 chicks was negative.

Gametocidal action — The research on gametocidal action was carried out by observation of the exo-flagellation of the microgametocytes, between slide

and coverslip, at the surrouding temperature, of the fresh blood of the controls and of the chicks under treatment. Every half-hour a sample was taken of the blood of chicks which showed many gametocytes and it was found that, on an average, exo-flagellation could be observed 10 to 15 minutes after the preparation was made. Examination of blood for a period of 6 to 8 hours showed that a 200 mg. dose did not prevent exo-flagellation. A smear preparation made after this period showed some gametocytes with protoplasm which seemed vacuolated and hyaline. In spite of this, no definite gametocidal action was proved to take place.

SULFAPYRIDINE

The M.L.D. sulfapyridine is 1500 mg./30 g. and the T. index is 17. In our work on the therapeutic action of sulfapyridine we used 5 chicks four of which received preventive treatment, three of them with 48 mg. of the drug. In two of them a small number of gametocytes were seen in the blood during the first 4 or 5 days of infection but no trophozoite or schizont. The brain smear of these three chicks showed no exo-erythrocytic schizonts, while inoculation of 2 chicks with the emulsion of half the brain and 0,5 cc. of the blood of one of them showed sterilization of the chick by the treatment. As a preventive measure also, one chick received a daily dose of 42 mg. of sulfapyridine, but this did not prevent the presence of a fairly large number of gametocytes and trophozoites during the whole period of treatment. The brain smear of this chick showed no exo-erythrocytic forms while inoculation with the blood and brain emulsion showed the presence of infective forms in the blood and brain of this chick. In one chick sulfapyridine did not prove to be effective as a curative agent in doses of 42 mg. as it did not prevent the presence of gametocytes and trophozoites in the blood nor of exo-erythrocytic schizonts in the brain.

SULFANILAMIDE

The minimum lethal dose of sulfanilamide is 600 mg./30 g. and the T. index is 20. The curative action of this drug was examined in the case of 5 chicks which received a dose of 30 mg.; after 2 or 3 days of treatment the blood of these chicks showed no schizonts though in one of them a very few gametocytes were observed till the end of treatment. The brain, liver and spleen smears showed exo-erythrocytic schizonts and the sterilization of 2 of these chicks could be proved by inoculation of two healthy chicks with an emulsion of half of the brain of each one of the chicks under treatment.

QUININE

The M.L.D. of quinine is 100 mg./30 g. and the T. Index is 2.

Only 3 chicks were used; one received a prophylactic dose of 50 mg. of quinine. There were, at the beginning of treatment, a very few trophozoites in the circulating blood but the animal died 18 days after inoculation with abundant exo-erythrocytic forms in the brain. The other 2 chicks which received 30 mg. as a curative dose showed a positive reaction of the blood from the second day of treatment onwards, and there were numerous trophozoites but no gametocytes or schizonts. These three chicks died with numerous exo-erythrocytic forms in the brain.

ATABRINE

The M.L.D. is 50 mg./30 g. and the T. index is 22. 6 chicks in all were treated with atabrine. Only two received prophylactic treatment with 2,2 mg.; this prevented the appearance of any erythrocytic forms, but not of exo-erythrocytic forms which were found in the brain 19 days after inoculation. The four chicks which received curative treatment with 2,2 mg. of atabrine showed a negative reaction in the blood, after 3 days of treatment, as regards schizonts and gametocytes but the blood was positive as regards trophozoites till the end of the treatment. The brain, liver and spleen of these chicks contained exo-erythrocytic forms.

PLASMOCHIN

The M.L.D. is 7,1 mg./30 g. and the T. index is 8. Prophylactic treatment with 0,8 mg. of the drug was given to two chicks. The blood of both was negative during the treatment and in one of them, on the eighteenth day after inoculation, there appeared schizonts and gametocytes. Exo-erythrocytic forms were found in this one while in the other they could not be shown to exist by direct examination. As curative treatment both chicks received the same dose, that is 0,8 mg. of plasmochin, but, even so, some very few exo-erythrocytic forms were found in the liver.

PROPHYLATIC AND CURATIVE ACTION OF SULFANILAMIDE, SULFADIAZINE AND SULFAPYRIDINE ON THE ERYTHRO AND EXO-ERYTHROCYTIC CYCLES OF "P. GALLINACEUM" IN CHICKS INOCULATED WITH SPOROZOITES

A true prophylactic against malaria is a drug which destroys the parasite before it invades the blood cell or during the period of incubation either by its action on the sporozoite itself or on the exo-erythrocytic forms produced during this period.

Most researchers work exclusively on malaria produced by injection of infected blood. Since the discovery of the exo-erythrocytic cycle it has been learned that this cycle is earlier and more marked when the inoculation is made with sporozoites and so the "sterilizing curative" and prophylactic action of the drug may be different. That is why we have also used, in our researches, malaria produced by inoculation of sporozoites to confirm the therapeutic and parasitological results obtained with malaria induced by injection of infected blood and also to bring about the prophylactic action under conditions similar to those of the naturally acquired disease.

The chicks were inoculated with sporozoites of *P. gallinaceum* in suspension in the salivary glands of the *Aedes aegypti* mosquito bred in the laboratory and allowed to feed, 13 or 15 days previously, on the blood of malarial chicks which contained abundant exo-flagellations of the microgametocytes. When the salivary glands, did not prove to be sufficiently rich in sporozoites, the glands of 2 or 3 other mosquitoes, richer in sporozoites, were added to them. The emulsion of these glands was injected into the chicks to be treated and, at the same time, into the controls (Table 2).

TABLE II

Table of results of therapeutic research on malaria produced by sporozoite inoculation

N.º of chicks	TREATMENT				BLOOD EXAMINATION	N.º of chicks with exo-Forms	STERILIZATION TEST				REMARKS
	Drug	Prophyl.	Curat.	Dose in mg.			Blood	Brain	Liver	Result	
1	S. D.	+	—	132		0	1	1	1	0	
1	S. D.	+	—	132	Positive after 17 days of inoculation	1	0	0	0	0	Single dose 1 hour before inoculation
1	S. D.	+	—	66		0	1	1	1	0	
1	S. D.	+	—	66	Positive after 10 days of inoculation	1	0	0	0	0	
2	S. D.	+	—	66		0	2	2	2	0	Daily dose for 4 days beginning 1 hour before inoculation
3	S. D.	+	—	2x66		0	3	3	3	0	For 4 days beginning 24 hours after inoculation
3	S. D.	+	—	2x66		0	3	3	3	0	For 4 days beginnning 4 days after inoculation
1	S. P.	+	—	2x84		0	1	1	1	0	For 4 days beginning
1	S.	+	—	2x10		0	1	1	1	0	24 hours after inoculation
4	S. D.	—	+	2x66	Trophozoites, pre-gametocytes and gamet. for 4-6 days	0	4	4	4	0	For 8-10 days beginning 2 to 3 days after the blood becomes positive
2	S. D.	—	+	2x33	Troph. pregamet. and gamet. for 6 days	0	2	2	2	0	
6	Controls	—	—	—	Positive 10-12 days after inoculation	6	0	0	0	0	Exo-forms in brain, liver and spleen

S. D. Sulfadiazine
S. P. Sulfapyridine
S. Sulfanilamide

Prophylactic treatment — Of the chicks inoculated with sporozoites 14 received prophylactic treatment and the rest remained as controls to show the efficiency of the inoculation. The blood of all the latter was positive 10 to 12 days after the inoculation and some of them received curative treatment. Prophylactic treatment with sulfadiazine was given in single or multiple doses as follows : 2 chicks received a single dose of 132 mg. 1 hour before inoculation ; 2 chicks received a single dose of 66 mg. 1 hour before inoculation ; 2 chicks received 66 mg. daily for four days beginning one hour before inoculation ; 3 chicks received 2 daily doses of 66 mg. each for 5 days beginning 6 hours after inoculation ; 3 chicks received 2 daily doses of 66 mg. for 4 days beginning on the fourth day of inoculation and finally one chick received as prophylactic treatment 2 daily doses of 84 mg. of sulfapyridine for four days beginning 24 hours after inoculation and one other chick received as prophylactic treatment 2 daily doses of 10 mg. of sulfanilamide for four days beginning 24 hours after inoculation. This prophylactic treatment was not effective in only 2 of the 14 chicks treated that is one of the chicks which received a single 132 mg. dose and that which received a single 66 mg. dose of sulfadiazine given in both cases one hour before inoculation. In all the other chicks the prophylactic treatment with sulfadiazine, sulfapyridine and sulfanilamide was effective. The chick

which was treated unsuccessfully with 132 mg. in a single dose showed a positive blood reaction after an incubation period of 17 days while the one that received an ineffectual single 66 mg. dose showed a positive blood reaction after an incubation period of 10 days. In these cases and in the controls it was observed that on the first day of the positive reaction gametocytes and mature schizonts appear simultaneously.

Fig. 1 — Phases in the evolution of the exo-erythrocytic schizonts of *P.gallinaceum*. Drawing made from a brain smear coloured by May-Grunwald-Giemsa. A — Immature schizont with protoplasm coloured deep blue and outline of nucleus undefined. B — More highly evolved form with pale blue protoplasm and nucleus well defined. C — Protoplasm slightly coloured and merozoites differentiated with horseshoe nucleus. The rupture probably took place during the preparation of the slide. D — Schizont which has degenerated under the action of sulfadiazine, very slightly coloured and showing scattered grains of chromatin.

All the controls showed a positive blood after an incubation period of 10 to 12 days for sporozoite inoculation and only 4 to 6 days for inoculation with infected blood. Three to five days after the blood became positive all the controls died and direct examination showed abundant exo-erythrocytic forms in the brain, liver and spleen.

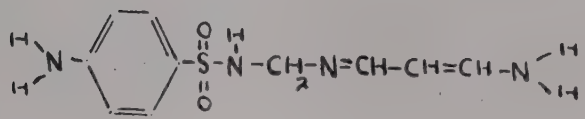
Curative treatment — Curative treatment lasted 8 to 10 days. Two daily 66 mg. doses of sulfadiazine were given to 4 chicks and it was observed that 24 hours later all the schizonts had disappeared from the circulating blood and numerous young blood cells made their appearence. Gametocytes, pregametocytes and trophozoites were present for 4 to 5 days during treatment.

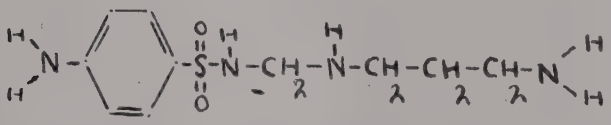
Proof of sterilization — The test of the sterilization of the chicks treated prophylactically or curatively and which did not show exo-erythrocytic forms when killed 21 days after inoculation was carried out by the inoculation of healthy chicks with an emulsion of half of the brain, the liver and the blood of each chick separately. The exo-erythrocytic schizonts were looked for in the brain, liver and spleen (Table 2).

This test showed that all the chicks treated prophlactically, except the two which received single doses of sulfadiazine, were really sterilised as were also those treated curatively with 2 daily doses of 66 mg. or 33 mg. of sulfadiazine, or 2 daily 84 mg. doses of sulfapyridine or daily 10 mg. doses of sulfanilamide. In one of them a smear made from the liver and the spleen showed no signs of erythrocytic schizonts but there was discovered, in a brain smear, in a reticuloendothelial (capilar) cell after careful search, a schizont with hyaline protoplasm, of a very light blue colour, containing grains of cromatin highly coloured irregular in size and irregularly disseminated. This schizont was considered as having degenerated under the action of sulfadiazine because though it was the size of an adult schizont and its protoplasm was very light blue in colour, this protoplasm showed no structure, was hyaline and in it no merozoites could be seen, but only scattered grains of chromatin. In previous examinations we found, in brain smears of chicks insufficiently treated with sulfadiazine, mature schizonts containing scattered chromatin grains of irreguiar size (fig. 1).

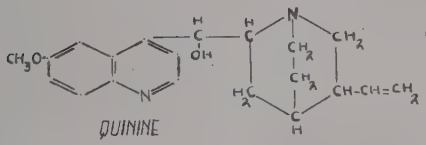
RELATION BETWEEN CHEMICAL STRUCTURE AND THERAPEUTIC ACTION

When we examine the chemical structure of anti-infection drugs of high therapeutic index, our attention is first of all called to the fact that trivalent nitrogen is constantly present. Ehrlich proved himself a genius when he foresaw that the organic arsenical compound most effective against spirochetes would have the schematic formula R — As — As — R and would contain an amine group and an oxide united with each one of the benzoic nuclei. Quinine contains 2 nitrogen groups while atabrine, plasmochin, certune and rhodoquine contain 3 atoms of nitrogen. Sulfanilamide contains 2 nitrogen groupings while sulfapyridine and sulfadiazine contain 3 and 4 atoms of nitrogen respectively. If we consider the pyrimidine chain as broken in its double union and later reduced, the result would be a lateral chain like that of plasmochin, atabrine, certune and rhodoquine with a smaller number of carbon atoms. This similarity is greater with the pyridine chain ; the whole however has only 3 atoms of nitrogen :

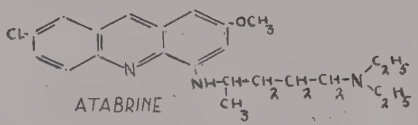




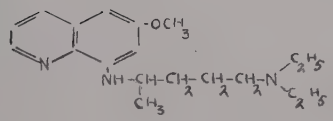
Of all the anti-infection drugs known sulfadiazine is one of those which contains the largest amount of nitrogen which antagonises the electro negative nature of the sulfona radical, thus diminishing its toxicity and making it highly anti-infective. Just as the fundamental anti-malarial group is 8-amino-quinoline, the nucleus of plasmochin, certune and rhodoquine and just as lateral chains of these three drugs increase their anti-malarial action, so sulfanilamide, which is also anti-malarial is the essentially active nucleus of sulfapyridine and sulfadiazine. Pyridine and pyrimidine decrease their toxicity and increase their anti-malarial power. Plasmochin, certune, rhodoquine, atabrine and quinine have a common nucleus, quinoline seeing that acridine the nucleus of atabrine may be considered as a derivative of quinoline :



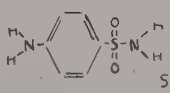
QUININE



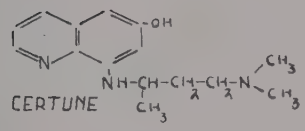
ATABRINE



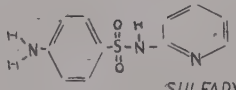
PLASMOCHIN



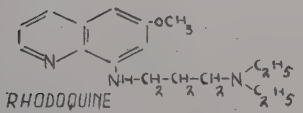
SULFANILAMIDE



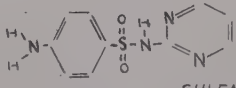
CERTUNE



SULFAPYRIDINE



RHODOQUINE



SULFADIAZINE

All five influence gametogony ; the last two act on the pregametocytes while the first three act directly on the gametocytes decreasing their exoflagellation and vacuolising their protoplasm. As atabrine and plasmochin have a common lateral chain and only plasmochin is distinctly gametocidal, it can be assumed that it is the quinoline nucleus with the 8-amine group which is responsible for the gametocidal action ; the lateral chain has a more marked influence on the erythrocytic schizonts.

Sulfadiazine, sulfapyridine and sulfanilamide have qualitatively the same action on the exo-erythrocytic schizonts, and as the nucleus common to these 3 therapeutic agents is p-amino-benzo-sulfonamide the schizonticidal action of the exo-erythrocytic forms must be attributed to this nucleus. Pyrimidine and pyridine by lessening toxicity would have a schizonticidal action on the erythrocytic forms.

Mechanism of the action of anti-malarial drugs

The question of the specificity of drugs for sporozoites, trophozoites, erythrocytic and exo-erythrocytic schizonts is a fundamental one in acquiring a knowledge of the prophylactic and curative action of these drugs and their power of preventing relapse. Quinine and atabrine have no action on the exo-erythrocytic schizonts but act on the erythrocytic schizonts which produce a constantly diminishing number of merozoites. The number of gametocytes decreases till they disappear from the circulation even when there are still trophozoites in the circulating blood. These trophozoites do not develop either into schizonts or into gametocytes. Plasmochin acts indifferently on schizonts and gametocytes especially the latter causing vacuolation of the protoplasm, disfiguring them and destroying their nucleus (25). Sulfonamides act by preventing the development of the histiotropic merozoite of exo-erythrocytic schizogony and of the hemotropic merozoite of erythrocytic schizogony. These drugs act like quinine, atabrine and plasmochin, by preventing the development of the trophozoite to complete the sexual cycle, they differ however in their action because they have a less pronounced effect on the development of the trophozoite of the sexual cycle which produces macro or microgametocytes. Their action is more intense on erythrocytic schizogony than on exo-erythrocytic schizogony, for when we do not observe erythrocytic schizogony but only gametogony it is frequent to find exo-erythrocytic forms. The sulfanilamides are not gametocidal. The inner mechanism of the action of quinine is not known although this drug has been used for more than 300 years. Its action is not directly on the parasite which can be incubated at 30° C. for 24 hours in a 1 : 100.000 solution of quinine and still cause infection (29). The effectual concentration in

the blood in the treatment of human malaria is 1:150.000. The action of quinine, atabrine and plasmochin is decreased by trypan blue which blockades the reticulo endothelial tissue (26); its action seems to be to increase the defensive power of the organism. Sulfadiazine, sulfapyridine and sulfanilamide sterilise the vertebrate host for *P.gallinaceum* by destroying the erythro and exo-erythrocytic schizogonies either after inoculation with sporozoites or with infected blood (fig. 3).

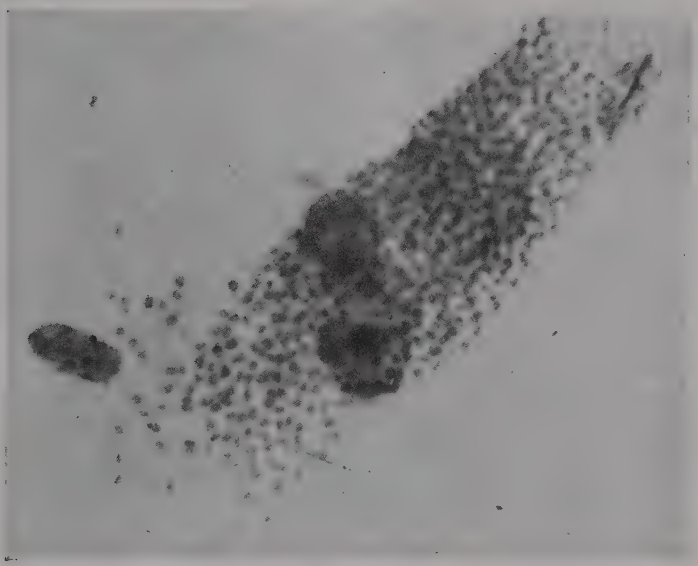


Fig. 2 — Microphotograph. Mature exo-erythrocytic schizont of *P.gallinaceum* in an endothelial cell of a brain capillary. The merozoites have a horseshoe-shaped nucleus. Eye piece. Leitz 20. Objective Zeiss Apochromatic x 90.

The mechanism of the action of sulfanilamide on plasmodia seems to be by facilitating the organic defence mechanism, making phagocytosis of the endothelial rete of the cells efficient. The action does not seem to be on the parasite itself because the effective therapeutic dose is smaller in the living animal than *in vitro*. In malarial ducks infected by *P.lophurae,* the mechanism of action is smilar to that of bacterial infections because in both cases the para-amino-benzoic acid antagonises the action of the sulfanilamides (26). Promin causes disappearance of the asexual forms of *P. cynomolgi* in rhesus but not of the gametocytes on which it acts directly causing degeneration with vacuolisation and hyaline protoplasm (1). *In vitro,* sulfanilamide, at a lower strength then is necessary to cure the malaria of rhesus produced by *P.knowlesi,* inhibits the respiration of this parasite but does not, in similar conditions, influence the respiration of *P.inui* (8) on which its

action is less active. It appears that the inner mechanism of the action of sulfanilamide is by inhibiting the respiration of the parasite as the neoarsphenamines do with the spirochetes by combining with the sulphohydrol group of the glutation thus inhibiting the respiratory metabolism of the spirochete (32). *In vitro* sulfadiazine and sulfapyridine also inhibit the respiration of *P. knowlesi* on which it has a sterilising action. *In vitro* sulfathiazol inhibits the respiration of *P. cathemerium* and *P. lophurae* though it does not influence the infection produced by these parasites. Therefore it can be assumed that the therapeutic action is not due to inhibition of the respiration of the parasite (35).

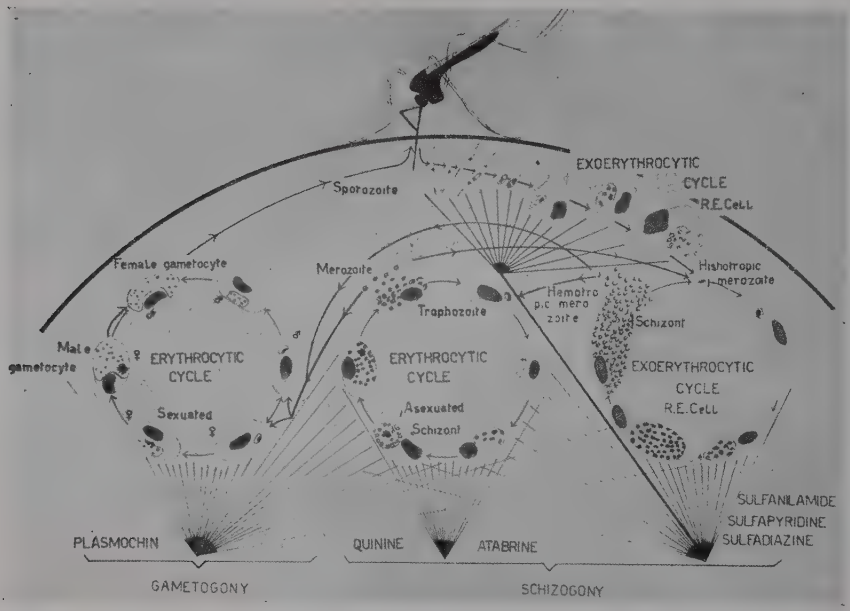


Fig. 3 — Semi-schematic drawing of the evolutionary cycle of *P. gallinaceum* in its vertebrate host and of the anti-malarial action of the derivatives of quinoline an those of p-amino-benzo-sulfonamide (sulfanilamide).

IMPORTANCE OF EXO-ERYTHROCYTIC SCHIZOGONY IN GAMETOGONY

Missiroli (30) states that the nucleus of the sporozoite, after inoculation, divides into 4 to 8 chromatin bodies which after rupture are liberated, surrounded by a small amount of protoplasm. According to the observations of Kikuth & Mudrow (9), Mudrow (15) and Paraense (16) it is known that before these bodies effect penetration or are destroyed by the cells of the subcutaneous endothelial rete, they develop within the histiocytes at the site of inoculation to the stage of mature schizonts which by rupture liberate the histiotropic merozoites which

are to complete exo-erythrocytic schizogony in the endothelial rete of the internal organs. By rupture of these there are liberated histiotropic merozoites which maintain the preceding cycle and hemotropic merozoites which complete with in the blood cells the erythrocytic schizogony and gametogonic cycles. After maturity the schizonts of the erythrocytic cycle liberate the hemotropic merozoites which renew this last mentioned cycle and also histiotropic merozoites to renew the exo-erythrocytic cycle (27) (31). The gametocytes sucked up by the mosquito produce in its stomach, by conjugation, zygotes and oocynets which after traversing the insect's stomach wall, go through the phase of oocysts and produce sporozoites which migrate to the salivary glands (fig. 3).

The behaviour of the gametocytes, schizonts and erythrocytic trophozoites as regards sulfadiazine, sulfapyridine and sulfanilamide suggests to us the possibility that the trophozoites of the sexual cycle originate partly or exclusively from the exo-erythrocytic merozoites without passing through the phase of erythrocytic schizogony.

Arguments for and against this hypothesis — 1. During insufficient preventive treatment with sulfadiazine, sulfapyridine or sulfanilamide, there appear, in the absence of erythrocytic schizonts, trophozoites pre-gametocytes and gametocytes. These trophozoites could have originated in erythrocytic schizogonies which take place in the blood of the internal organs as happens with certain species of plasmodia ; however the examination of the blood and of smears of these organs do not confirm this hypothesis.

2. Why do the gametocytes disappear from blood after 2 or 3 days under the action of quinine or atabrine seeing that the exo-erythrocytic forms are not destroyed by these drugs ? Possibly it is because they prevent the evolution of trophozoites of asexual and sexual cycles while sulfonamides in insufficient doses prevent the evolution only of the asexual trophozoites.

3. When gametocytes and trophozoites are present till the end of treatment with sulfonamides, exo-erythrocytic schizonts are not met with in the brain capillaries, in the liver and in the spleen, and this indicates that gametogony only takes place in conjunction with the coexistence of exo-erythrocytic forms.

4. Finally the analogy between the genus *Haemoproteus* and *Plasmodium* is well known as regards the histrocytic cycle. In *Haemoproteus columbae* for example, the trophozoite also develops, in the endothelial rete of the dove's lung, from the stage of merozoite to that of merozoite cyst or schizont which ruptures liberating the merozoites that complete gametogony in the blood cells (28).

5. It could be assumed that the merozoites pre-gametocytes and gametocytes observed after the administration of relatively small doses

of sulfonamides as prophylactic treatment, in cases of inoculation with infected blood, had originated from the erythrocytic schizonts inoculated and not from exo-erythrocytic schizonts. This hypothesis is not a true one since after sporozoite inoculation, insufficient preventive treatment will allow trophozoites, pre-gametocytes and gametocytes to appear in the circulating blood in the absence of erythrocytic schizonts.

6. In malaria produced by inoculation of sporozoites it can be observed that at the beginning of the blood infection, it is already possible to see gametocytes even in the absence of any mature erythrocytic schizonts.

We have to thank the undergraduate Constantin Cristoff for the help he has given us.

SUMMARY

After a review of the research carried out on the action of different sulfonamides, a brief summary was made of our present knowledge about the exo-erythrocytic cycle of the plasmodia of malaria and of the action of anti-malarial drugs on this cycle. The research on the anti-malarial action of quinine, atabrine and plasmochin was carried out along with research on the action of sulfadiazine, sulfapyridine and sulfanilamide to determine the relative influence of these therapeutic agents on the erythro and exo-erythrocytic cycles and of gametogony and schizogony in these cycles ; another object was to determine their relative therapeutic index. As has already been stated, quinine, atabrine and plasmochin although effective when the blood contains a number of parasitic forms of *P. gallinaceum*, are not prophylactic either in blood or in sporozoite inoculation (23). With these three anti-malarial agents it is found, by blood examination, that comparatively slightly efficient doses enable trophozoites to appear of to become exclusively permanent in the case of prophylactic or of curative treatment respectively. With doses which act efficiently on the erythrocytic cycle, these drugs are ineffective as regards the exo-erythrocytic cycle; on the other hand sulfanilamide, sulfapyridine and sulfadiazine in relatively small doses makes it possible for the temporary or permanent presence in the blood of trophozoites, pre-gametocytes and gametocytes but there are no immature or mature schizonts. In larger doses these drugs prevent the appearance or permanence of any erythrocytic form and also destroy the exo-erythrocytic forms. It is certain that sulfadiazine was sterilising in the case of blood inoculation in doses of 33 mg. given either prophylactically or curatively. Sulfapyridine was preventive in doses of 42 mg. but was not efficient when administered curatively, in this dose.

Sulfanilamide, in curative doses of 30 mg., was effective in the case of five chicks treated ; the test of sterilization was made in only 2 of these cases but this test confirmed the negative result as regards exo-erythrocytic schizonts. Sulfanilamide was sterilizing for exo-erythrocytic schizonts in smaller doses than those of sulfapyridine and sulfadiazine which produced the same effect, but its therapeutic index is 20 while that of sulfapyridine is 17 and that of sulfadiazine is over 90. After inoculation with sporozoites, sulfadiazine was prophylactic in 66 mg., doses given one hour before inoculation or 66 mg. daily doses given for four days beginning from the time of inoculation. This sulfonamide is curative for erythro and exo-erythrocytic forms when given in two daily 33 mg. doses.

Sulfapyridine was also prophylactic in 84 mg. doses given twice a day for four days after inoculation and sulfanilamide in 10 mg. doses given twice a day for four days after inoculation with sporozoite.

By a comparison of the structure of quinine, atabrine, plasmochin and certune it can be assumed that 8-amino-quinoline, the structure common to the last three, is responsible for the gametocidal action and also that the lateral chain common to atabrine and plasmochin is responsible for the schizonticidal action of the erythrocytic cycle. By a comparison between the chemical structure and the anti-malarial action of sulfadiazine, sulfapyridine and sulfanilamide, it has been concluded that the common structure which is responsible for the specific action on exo-erythrocytic schizonts is p-amino-benzo-sulfonamide.

Some remarks were made on the mechanism of action of the anti-malarials. From the facts gleaned about the anti-malarial action of the sulfonamides studied, we may conclude that the gametocytes originate in the hemotropic merozoites of the gametogonic line, formed in the exo-erythrocytic schizonts which complete this cycle without passing through the stage of exo-erythrocytic schizogony.

CONCLUSIONS

1. Sulfadiazine, sulfapyridine and sulfanilamide are prophylactic for chicken malaria produced by *P.gallinaceum* and brought about either by blood infection or sporozoite infection ; the prophylactic effect is due to destruction of the exo-erythrocytic schizonts.

2. These 3 sulfonamides are curative for the exo-erythrocytic forms of *P.gallinaceum* in malaria induced by inoculation of infected blood or sporozoites.

3. Sulfadiazine is not gametocidal.

4. The prophylactic and curative actions on the erythro and exo-erythrocytic forms are in quality the same for these three anti-malarial drugs but they vary in quantity.

5. The common nucleus responsible for the prophylactic and curative anti-malarial action on the erythro and exo-erythrocytic forms is p-amino-benzo-sulfonamide. Pyridine and pyrimidine lessen the toxicity and increase this specific action.

6. The anti-malarial action of sulfadiazine, sulfapyridine and sulfanilamide is more intense on erythrocytic schizogony then on exo-erythrocytic schizogony and it is still less intense on gametogony.

7. The gametocytes of *P.gallinaceum* orginate in the hemotropic merozoites of the sexual line, formed in the exo-erythrocytic schizont which effects gametogony directly inside the blood cells without undergoing erythrocytic schizogony under the action of insufficient doses of the sulfonamides studied, the evolutionary cycle of *P.gallinaceum* is similar to that of *Haemoproteus,* that is, only exo-erythrocytic schizogony and gametogony persist.

8. These three sulfonamides offer a real advantage over quinine, atabrine and plasmochin because of their prophylactic and curative action on the exo-erythrocytic schizonts ; of the three sulfadiazine is the best because of its high therapeutic index.

9. For any given dose, the prophylactic action of sulfadiazine is stronger than its curative action.

SUMÁRIO

Depois de uma revisão das pesquisas da ação antimalárica de diversas sulfonamidas, foi feito um breve resumo dos conhecimentos atuais sôbre o ciclo exo-eritrocitário dos plasmódios da malária e da ação dos anti-maláricos sôbre este ciclo.

A pesquisa da atividade antimalárica da quinina, atebrina e plasmoquina foi realizada, ao lado da pesquisa da ação da sulfadiazina, sulfapiridina e sulfanilamida, para observação do poder relativo destes agentes quimioterápicos, sôbre os ciclo éritro e exo-eritrocitários, e nestes, sôbre a gametogonia e esquizogonia. Teve também como finalidade a determinação do índice terapêutico relativo. Como já foi referido, a quinina, a atebrina e a plasmoquina, se bem que eficientes quando o sangue contém numerosas formas parasitárias do *P. gallinaceum,* não é profilática, seja no caso da inoculação com sangue ou com esporozóito (23). Com estes 3 antimaláricos verificamos pelo exame de sangue, que dose relativamente pouco eficiente, permitem o aparecimento ou a permanência exclusiva de trofozóitos, no caso do tratamento profilático ou curativo respectivamente. Com doses eficientes sôbre o ciclo eritrocitário, estes medicamentos são ineficazes sôbre o ciclo exo-eritrocitário.

A sulfanilamida, sulfapiridina e sulfadiazina por outro lado, em doses relativamente pequenas, permitem o aparecimento ou permanência no sangue, de trofozóitos, de pregametócitos e de gametócitos, na ausência de qualquer esquizonte jovem ou maduro. Em doses maiores, estes medicamentos impedem o aparecimento ou permanência de qualquer forma eritrocitária, destruindo também as exo-eritrocitárias.

A sulfadiazina foi com segurança esterilizante no caso da inoculação com sangue na dose de 33 mg. quer administradas profilática ou curativamente, enquanto que a sulfapiridina só o foi preventiva na dose de 42 mg., não tendo esta eficiência, quando esta dose foi administrada curativamente.

Por sua vez a sulfanilamida se mostrou eficaz em 5 pintos tratados com dose curativa de 30mg., tendo sido a prova de esterilização, tirada apenas em 2 deles, a qual confirmou a negatividade para esquizontes exo-eritrocitários.

A sulfanilamida se mostrou esterilizante para os esquizontes, exo-eritrocitários em dose inferior àquelas de sulfapiridina e de sulfadiazina que tiveram o mesmo efeito, porém o seu índice terapêutico é 20 enquanto o da sulfapiridina é 17 e o da sulfadiazina é maior que 90.

Com inoculação de esporozóito a sulfadiazina foi profilática com dose única de 66 mg. administrados 1 hora antes da inoculação, ou de 66 mg. diariamente durante 4 dias, a partir da inoculação. Esta sulfonamida, é curativa das formas éritro- e exo-eritrocitárias com 2 doses diárias de 33 mg.

A sulfapiridina foi também profilática com dose de 84 mg. 2 vezes ao dia durante 4 dias a partir da inoculação e a sulfanilamida com dose de 10 mg. também 2 vezes ao dia durante 4 dias a partir da inoculação, no caso desta ser feita com esporozóito.

Da comparação entre a estrutura da quinina, atebrina, plasmoquina e certuna, pode-se admitir que seja a 8-amino quinoleina a estrutura comum aos 3 últimos, responsavel pela ação gametocida e que seja a cadeia lateral comum à atebrina e à plasmoquina a responsavel pela ação esquizonticida do ciclo eritrocitário. Da comparação entre a estrutura química e a ação antimalárica da sulfadiazina, sulfapiridina e sulfanilamida, concluiu-se que, a estrutura comum, responsavel pela ação específica sôbre os esquizontes exo-eritrocitários, é a p-amino-benzo-sulfona-amida.

Foram feitas considerações sôbre o mecanismo de ação dos antimaláricos. Dos achados sôbre a ação antimalárica das 3 sulfonamidas estudadas, podemos concluir que os gametocitos têm origem nos merozóitos hemotrópicos da linhagem gametogônica, formados nos esquizontes exo-eritrocitários, os quais realizam este ciclo sem passar pela esquizogonia eritrocitária.

CONCLUSÕES

1. A sulfadiazina, sulfapiridina e sulfanilamida são profiláticas da malária da galinha produzida pelo *Plasmodium gallinaceum*, obtida seja pela inoculação de sangue infectado ou de esporozóito, pela destruição dos esquizontes exo-eritrocitários.

2. Estas 3 sulfonamidas são curativas das formas exo-eritrocitárias do *P.gallinaceum* da malária induzida pela inoculação de sangue infectado ou de esporozóito.

3. A sulfadiazina não é gametocida.

4. As ações profilática e curativa das formas éritro- e exo-eritrocitárias são qualitativamente as mesmas para estes 3 agentes antimaláricos, variando quantitativamente.

5. O núcleo comum responsavel pelas ações antimaláricas, profilática e curativa, das formas éritro- e exo-eritrocitárias é a p-amino-benzo-sulfonamida. A piridina e a pirimidina diminuem a toxidade e aumentam esta ação específica.

6. A ação antimalárica da sulfadiazina, sulfapiridina e sulfanilamida é mais intensa sôbre a esquizogonia eritrocitária do que sôbre a exo-eritrocitária, e menor ainda sôbre a gametogonia.

7. Os gametócitos do *P.gallinaceum*, têm origem no merozóito hemotrópico da linhagem sexuada, formado no esquizonte exo-eritrocitário, o qual realiza diretamente a gametogonia, no interior das hemátias, sem passar previamente pela esquizogonia eritrocitária.

Sob a ação de doses insuficientes das sulfonamidas estudadas, o ciclo evolutivo do *P.gallinaceum* se assemelha ao do *Haemoproteus*, isto é, só persistem a esquizogonia exo-eritrocitária e a gametogonia.

8. Estas 3 sulfonamidas oferecem real vantagem sôbre a quinina, atebrina e plasmoquina, por sua ação profilática e curativa dos esquizontes exo-eritrocitários, e dentre elas, a sulfadiazina se mostra superior pelo seu alto índice terapêutico.

9. Na mesma dose, a sulfadiazina tem maior ação profilática do que curativa.

BIBLIOGRAFIA

1. COGGESHALL, L. T., MAIER, J. & BEST, C. A., 1941, The effectiveness of two new types of chemotherapeutic agents in Malaria. *Amer. J. Med. Ass.*, 117 : 1077-1081.

2. COGGESHALL, L. T., 1938, The cure of *Plasmodium Knowlesi* Malaria in Rhesus monkey with Sulfanilamide, and their susceptibility to reinoculation. *Amer. J. Trop. Med.*, 18 : 715-721.

3. COGGESHALL, L. T., 1940, The selective action of Sulfanilamide on the parasites of experimental Malaria in monkey *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 71 : 13-20.

4. READ, H. & PINO, J. O., 1938, Versuche mit den Sulfonamid Präparaten bei der Malariabehandlung. *Arch. Schiffs-u. Tropen hyg.*, 42 : 132-134.

5. HALL, W. E. B., 1938, Sulfanilamides in tertian Malaria. *J. Pharmacol.*, 63 : 353-356.

6. SCHWARTS, L., FURST, W. & PLIPIN, H., 1941, Sulfathiazole as an antimalarial. *Amer. J. Hyg. Sec. C.*, 34 : 160-162.

7. MANWELL, R. D., COUNTS, E. & COULSTON F., 1941, Effect of Sulfanilamide and Sulfapyridine on Avian Malarias. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 46 : 523-525.

8. MARSHALL, E. R. Jr., LIFCHFIELD, J. T. & WHITE, H. J., 1942, Sulfanilamide therapy of Malaria in ducks. *J. Pharmacol.*, 75 : 89-104.

9. KIKUTH, W. & MUDROW, L., 1938. Die endothelialen der Malariaparasiten in Experiment und Theorie. *Zbl. Bakt.*, 142 : 113-132.

10. JAMES, S. P. & TATE, P., 1938. Exo-erythrocytic schizogony in *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt 1935). *Parasitology*, 30 : 128-139.

11. JAMES, S. P. & TATE, P., 1937, New knowledge of the life-cycle of Malaria parasites. *Nature*, 139 : 545-549.

12. GRASSI, C. B., 1901, *Die Malaria*, Studien Eines Zoologen. Jena.

13. RAFFAELE, G. 1934, Un ceppo italiano di *Plasmodium elongatum*. *Riv. Malariol*, 13: 3-8.

14. PORTER, R. J. & HUFF, C. G., 1940, Review of the literature on exoerithrocytic schizogony in certain malarial parasites in *Plasmodium elongatum*. *Amer. J. Trop. Med.* 20: 869-888.

15. MUDROW, L., 1940, Klinische und Parasitologische Befund und Chemotherapeutische Ergebnisse bei der Huhnermalaria. *Arch. Schiffs. u. Trop. hyg.*, 44 : 257-275.

16. PARAENSE, L., 1943, Aspectos parasitológicos observados no local inoculado com esporozoito de *Plasmodium gallinaceum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 38: 353-359.

17. SEETHARAMA IYER, P. V., SHORTT, H. E. & MENON, K. P., 1941. The stage of *Plasmodium gallinaceum* found in the incubation period. Second observation. *J. Mal. Inst. India*, 4: 179-180.

18. RAFFAELE, G., 1938, La fase primaria dell evoluzione monogonica dei parassiti malarici. *Riv. Malariol*, 17: 331-343.

19. RODHAIN, J., 1939. L'infection a *Plasmodium relictum* chez le pingouins. *Ann. Parasit.*, 17 : 139-157.

20. KIKUTH, W. & MUDROW, L., 1939, Chemotherapeutische Untersuchungen an den Endothelialen Formen (E. Stadien) des *Plasmodium cathemerium*. *Z. ImmunForsch.*, 95: 285-307.

21. HEGNER, R. & MANWELL, R. D., 1927, The effects of Plasmochin on Bird-Malaria. *Amer. J. Trop. Med.*, 7: 279-285.

22. PARAENSE, L. & SILVA, E. M., 1941, Esquizogonia exoeritrocitária do *Plasmodium falciparum*. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 20 : 99-106.

23. BRUMPT, E., BOVET, D. & BRUMPT, L., 1937, Action des médicaments antipaludiques sur l'infection de la poule par le *Plasmodium gallinaceum*. *Feschr. Nocht., Hamburg.*, 11: 180-184.

24. VELICK, S. F. & SCUDDER, J., 1940. Plasma potassium level in avian Malaria. *Amer. J. Hyg., Sec. C.*, 31 : 92-94.

25. COATNEY, G. R., 1935, The effects of Atabrin and Plasmochin on the *Haemoproteus* infection on the pigeon. *Ann. J. Hyg.*, 21 : 249-254.

26. MARSHALL, E. K. Jr., 1942, Chemotherapy of Avian Malaria. *Physiol. Rev.*, 22 : 190-204.

27. COULSTON, F. & MANWELL, R. K., 1941, Single parasite infection and exoerythrocytic schizogony in *Plasmodium circumflexum*. *Amer. J. Hyg.* 34: 119-125.

28. ARAGÃO, H. B., 1908, Uber den Entwicklungsgang und die Ubertragung von *Haemoproteus columbae*. *Arch. Protistenk.* 12: 154-167.

29. KIRSCHBAUM, W., 1923, Methoden und Kautelen eines Malaria-Blut-Konservierung und Versendung zur Behandlung der Progressiven Paralyse. *Klin. Wschr.*, 2 : 1404-1406.

30. MISSIROLI, A., 1938, Sullo sviluppo dei parassiti malarici. *Riv. Malariol.*, 13 : 539-552.

31. JAMES, S. P., 1939 The incidence of exoerythrocytic schizogony in *Plasmodium gallinaceum* in relation to the mode of infection. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.*, 32 : 763-769.

32. VOEGTLIN, C., 1925, The pharmacology of Arsphenamine (Salvarsan) and related arsenical. *Phys. Rev.*, 5: 63-94.

33. SINTON, J. A., HUTTON, E. L. & SHUTE, P. G., 1939, Some successful trials of Proseptasine as a true causal prophylactic against infection with *Plasmodium falciparum*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 33: 37-44.

34. BARRETTO, M. P., 1943, Malária aviária : III. Sôbre o encontro de formas exo-eritrocitárias do *Plasmodium juxtanucleare* (Versiani & Gomes, 1941) *O Hospital*, 24 : 643-645.

35. MAIER, J., 1941, *Experimental chemotherapy in Malaria*. A Symposium on Human Malaria., pp. 268-272. Washington.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):49-50
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

UMA NOVA ESPÉCIE DE "TACHYGONUS" (Col., Curculionidae) [1]

OSCAR MONTE
Instituto Biológico, São Paulo

(Com uma figura no texto)

Tachygonus pubescens n. sp.

Castanho claro, com manchas escuras sôbre os élitros e pronoto. Todo o corpo e patas cobertos de pêlos escuros e dourados.

Cabeça escura, fortemente pontuada e com leve pubescência amarelada que se bifurca ao alcançar a base do rostro, sendo que nesta parte ela se apresenta mais espalhada e de um colorido mais claro.

Olhos pretos e grandes, tomando toda a parte anterior da cabeça e apenas separados pela faixa de pêlos acima mencionada.

Fig. 1 — *Tachygonus pubescens* n. sp.

Antenas castanhas, longas, 7-articuladas, com massa bem desenvolvida e cobertas de pêlos amarelados.

[1] Recebido para publicação a 3 de Fevereiro de 1944.

Rostro grosso, curto e chato, pontuado nos lados e liso no centro ; da base até a parte central, escuro e depois ligeiramente amarelado.

Pronoto castanho-escuro com pontuações profundas e largas, salvo uma pequena área que se apresenta bastante lisa e brilhante. De muitas das pontuações saem escamas pequenas e douradas que se condensam em algumas partes, especialmente junto aos élitros, formando disfarçada linha mais ou menos avermelhada nos lados. Os flancos quase totalmente cobertos por densa pubescência de escamas douradas e na altura das coxas nota-se uma aglomeração de escamas brancas. Na parte superior e lateral podem ser vistos um grande número de pêlos longos, pretos e castanho-dourados, sendo que os do noto são em sua maior parte, pretos.

Élitros largamente cordiformes, amarelo-escuros, bem achatados até a quarta estria, tão longos quanto largos e profundamente pontuados, são cobertos de escamas douradas e de pêlos desta côr e escuros ; ombros fortemente proeminentes. A linha sutural coberta de pêlos dourados que se cruzam e quase junto ao escutelo uma pequena condensação de escamas douradas. Seis tufos (três em cada élitro), um na metade entre os ombros e a linha sutural e os outros dois, quase no ápice. Os flancos fortemente peludos.

Patas com os dois primeiros pares amarelados e cobertos de pêlos do mesmo colorido ; o último par muito comprido, com o fêmur amarelado e coberto de pêlos da mesma côr, porém o ápice engrossado e escurecido, trazendo uma faixa amarela no centro da mancha escura. Em cada fêmur se encontra uma série de espinhos, sendo 4 pequenos, seguindo-se uma outra série de 4 maiores longos e pretos, dos quais o primeiro é bem maior que os outros e que decrescem à proporção que se dirigem para o ápice. As tíbias achatadas e escuras (salvo a base, e ápice onde se nota uma leve tonalidade amarelada), côncava interna e convexa externamente, no centro é lisa e densamente coberta de pêlos longos e escuros, nas margens. Os tarsos amarelados e cobertos com pêlos do mesmo colorido.

Parte inferior do corpo, preta e com inúmeros pêlos amarelados.

Comprimento : 3.41 mm. ; largura (tomada nos ombros), 2.17 mm.

Holótipo(fêmea) colhido pelo Sr. J. Guerin, em Jabaquara, São Paulo (Capital), em janeiro de 1944, em cuja coleção está depositado ; alótipo (macho) colhido pelo Sr. H. Zelibor, em Jabaquara, em Janeiro de 1944, na coleção do autor.

A espécie é próxima de *T. fasciculosus* Boh., porém se distingue pela presença de dois tufos de cada lado da sutura elitral ; pelos cinco dentes dos fêmures posteriores; pela densa pubescência dos tarsos. Por este último aspecto se aproxima do gênero *Tachygonidius* Champion.

SUMMARY

A NEW SPECIES OF TACHYGONUS (COL. CURC.)

This species is one of the largest of the Brazilian fauna. It nearest allied species is *T. fasciculosus* Boh., but separated from it by the two tufts on each side of the suture and near to the declivity of the elytra ; by the quinquedentate posterior femora ; by the posterior tarsi enveloped in a dense brush of long yellow hairs. This last aspect brings this species closer to the genus *Tachygonidius* Champion, but it is a true *Tachygonus* because of the antennae 7-jointed funiculus.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):51-62
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

THE FLAVIANIC ACID METHOD FOR ESTIMATION AND EXTRACTION OF ARGININE [1]

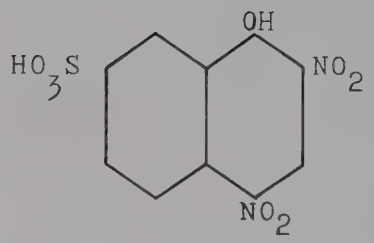
M. ROCHA E SILVA and SYLVIA O. ANDRADE
Instituto Biológico, São Paulo

(With 2 text-figures)

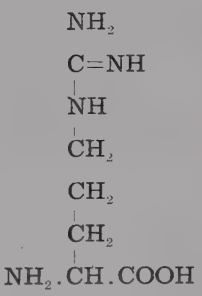
In 1924, KOSSEL & GROSS (1) described a compound of arginine with the 2,4.dinitro α.naphtol 7.sulfonic acid (flavianic acid). This compound is fairly soluble in alkaline medium, yielding a sparingly soluble crystalline material when the medium is acidified to Congo. Since then, the use of flavianic acid for extraction and estimation of arginine present in biological material has been advocated by many investigators (1, 2, 3, 4).

Flavianic acid can form two easily crystallizable salts with arginine: the mono- and the di-flavianate. Under the conditions of KOSSEL & GROSS' work, the contamination of the monoflavianate with diflavianate crystals has not been excluded. More recently, VICKERY (5) worked out a method of arginine estimation, consisting of a precipitation of the arginine diflavianate after treatment of the strongly acidified protein hydrolysate with a hot solution of flavianic acid. The compound obtained in this first step was transformed into the monoflavianate by recrystallization under standard conditions. The monoflavianate so obtained was collected, dried and weighed. The main characteristics of VICKERY's method consisted in transforming the whole bulk of diflavianate obtained in the first step into a crystalline mass, which, under the conditions stipulated in his method, would consist exclusively of the monoflavianate compound. This goal was attained in his method by avoiding any excess of mineral acid and by keeping the temperature high enough during the crystallization process. Those conditions should be entirely unsuitable for the production of the diflavianate compound and the crystalline mass obtained consisted exclusively of the arginine monoflavianate.

[1] Received for publication January 13, 1944.



Flavianic acid
M.W. 314.12



Arginine
M.W. 174.14

Arginine monoflavianate M.W. 488.26
Arginine diflavianate M.W. 662.40

In attempting to follow strictly VICKERY's procedure in this laboratory, we have had many difficulties, consisting mainly in the obtention of a good precipitation of the pure monoflavianate under the conditions stipulated by VICKERY. The use of only mineral acid in slight excess, by keeping the reaction neutral to Congo, was often followed by slow crystallization and poor yields of the compound. The use of acetic acid, as described below, allowed a more prompt and reliable crystallization of the arginine monoflavianate. Furthermore, VICKERY's procedure can only be employed when one can dispose of considerable quantities of tissue material. Following his procedure, one has to dispose of a material giving 450 to 500 mg. of arginine monoflavianate at the final step. This amount corresponds roughly to an arginine content of 160 to 180 mg. This amount of arginine is usually contained in 3 to 4 grams of dry protein material derived from living tissues. The convenience to work on smaller quantities of material, as in physiological experiments, led us to try to work out VICKERY's method on semi-micro conditions. The alterations introduced in VICKERY's method, however, are slight, the main lines of it being followed rather closely.

The obtention of the arginine monohydrochloride, by using KOSSEL & GROSS' method has been checked up in the present paper. We have obtained at a first step, a mixture of arginine mono- and diflavianates. The transformation of this impure crystalline material directly into the monohydrochloride, as indicated in KOSSEL & GROSS' paper, however, results in a rather 2nd grade material which must be recrystallized several times. On the other hand, the modification described in (6) consisting mainly in increasing the volume of added water and keeping

the crystallizing mixture for 3 hours at room temperature, reduces the yield at the first crystallization, while still giving an impure mass of arginine monoflavianate. The modification proposed in the present paper, consists in precipitating a rather impure mixture of di- and monoflavianates in strongly acidified medium, followed by recrystallization in order to obtain a good grade arginine monoflavianate preparation. The transformation of this pure compound directly into the arginine monohydrochloride yields quantitatively a satisfactorily high grade material.

EXPERIMENTAL

I. Extraction of arginine from gelatine.

Preparation of the arginine monoflavianate : The hydrolysis of 100 g. of gelatine is performed by boiling it under reflux in the presence of 500 cc. of concentrated HCl. The hydrolysis is continued for 6 to 8 hours. The excess of HCl is removed by evaporation *in vacuo* and the process of removing the HCl is brought forth by two sucessive additions of 300 cc. of water, until approximately 1 liter of water has been distilled off. The concentrated syrup is then dissolved in water, decolorized with activated charcoal and the final volume made up to 600 cc. The hydrolysate is then kept near the boiling point in a water bath and 100 cc. of a 20% hot solution of flavianic acid added with strong stirring and scratching. The precipitation of a crystalline yellow-orange mass of flavianates starts almost immediately. The mixture is left over night in the ice-box. The flavianate mass is collected in Buchner, washed with cold water and alcohol and redissolved in boiling water (600 cc.) by addition of a minimum of concentrated ammonium hydroxide. The precipitation of the crystalline monoflavianate follows the neutralization of the hot mixture by adding concentrated HCl. The mixture is further acidified while still hot, with 10 cc. of glacial acetic acid. The criterion of purity for the monoflavianate obtained consists in the homogeneity of the bright golden yellow crystals showing the appearance of lustrous plates. This appearance is easily obtained if crystallization is performed under the above conditions. After standing over night, the monoflavianate is collected, washed with cold water and alcohol and dried at 110° to 120° in an oven. Yield : 18 grams.

Preparation of the arginine monohydrochloride : 25 grams of dry recrystallized arginine monoflavianate are suspended in 500 cc. of hot water and a hot solution of 50 g. of baryum hydroxide in 300 cc. of water is slowly added under strong stirring. The mixture is then filtred hot through a Buchner, the precipitate removed again to a beaker and treated again with a hot solution of 10 g. of baryum hydroxide in 300 cc. of water stirred for 3 to 5 minutes and filtred again. The baryum flavianate is washed several times with hot water and saved for recovery of the flavianic acid. The filtrates are then treated with a strong current of CO_2 until slightly acid to litmus. The baryum carbonate precipitated is removed, and the clear filtrate concentrated *in vacuo* to 100 cc. approximately. The precipitated baryum carbonate is removed again by filtration and the clear filtrate is acidified to Congo with 3 N hydrochloric acid and boiled for 3 to 5 minutes with charcoal. After removal of the charcoal, the filtrate must be perfectly clear as pure water. If not, the decolorizing treatment must be retaken. The filtrate is finally carefully neutralized with NH_4OH, until

slightly alkaline to litmus and concentrated again *in vacuo*. The sirupy residue is dissolved in a minimum of water (20 to 30 cc.) and treated with 600 to 800 cc. of absolute alcohol (the alcohol must be added slowly, until a slight cloudness is formed; a few crystals of arginine monohydrochloride are added and scratching started; more alcohol is then carefully added). The mixture is left over night in the ice-box. The white mass of crystals is collected in Buchner, washed with cold alcohol and dried at 80° to 100° in an oven. Yield: 9.1 g. of a material melting at 215° to 217°.

Analysis: Two samples of 10.7 mg. of dry arginine monohydrochloride were treated with 50 mg. of flavianic acid, under the conditions of the semi-micro method described below. The crystalline monoflavianate so obtained weighed 24.4 and 24.6 mg. corresponding to 24.9 and 25.1 mg. (average 25.0 mg.) after correcting the figures with the 2% solubility coefficient, as indicated below. The theoretical value expected would be 25.1 mg. of arginine monoflavianate.

II. Recovery of the arginine monoflavianate.

Macro-method: Weighed samples of twice recrystallized arginine monoflavianate (between 100 mg. to 500 mg.) showing its characteristic golden luster, are dissolved in 20 cc. distilled water, by addition of 1 cc. of 3N ammonium hydroxide. The solution is filtred hot through paper, under suction. The flask and the filter paper are thoroughly washed with distilled water. The clear filtrate is heated, neutralized with an equivalent of HCl and 1 to 2 cc. of glacial acetic acid added to the hot mixture. Crystallization follow either instantaneously or during the first 5 to 10 minutes standing. The crystallizing mixture is kept over night in the ice-box. The precipitate showing the characteristic golden yellow luster is collected in small Gooch crucibles over asbestos, and dried in an oven at 110° until constant weight. The results are shown in Table I.

TABLE I

RECOVERY OF ARGININE MONOFLAVIANATE FOLLOWING MACRO PROCEDURE

WEIGHED AMOUNTS (mg)	AMOUNTS RECOVERED (mg)	ABSOLUTE DIFFERENCES	PER CENT DIFFERENCES
254.9	249.1	— 5.8	— 2.3
184.6	178.3	— 6.3	— 3.4
263.5	258.7	— 4.8	— 1.8
363.8	354.6	— 9.2	— 2.5
275.3	266.7	— 8.6	— 3.1
385.0	378.5	— 6.5	— 1.6
199.9	193.0	— 6.9	— 3.0
489.6	477.6	—12.0	— 2.4
349.5	339.4	—10.1	— 2.8
385.8	375.6	—10.2	— 2.6
499.4	485.8	—13.6	— 2.7
615.7	505.3	—10.4	— 2.0
302.7	299.1	— 3.6	— 1.2
331.3	327.2	— 4.1	— 1.3
315.4	310.5	— 4.9	— 1.5
306.2	302.5	— 3.7	— 1.2
	Average.....	.....	— 2.2

Semi-micro method: The weighed samples of arginine monoflavianate (30 to 50 mg) are dissolved in 3 cc. of water + 0.3 cc. of 3N ammonium hydroxide in a 15 cc. beaker. The solution is filtred hot through a 1.5 cm. diameter Buchner funnel. The beaker and funnel are carefully washed with 3 portions of 2 cc. hot water and the filtrates (7 to 10 cc.) are collected in 25 cc. Kitasatos and the temperature kept close to the boiling point in a water bath. An equivalent (0.3 cc.)

of 3N HCl is added + 0.5 cc. glacial acetic acid. The crystallization of the arginine monoflavianate follows almost immediately or at least in 5 to 10 minutes. Kept over night in the ice-box. The precipitate is collected in appropriate small bags of filter paper adjusted over small glass Buchner funnels (fig. 1), washed twice with a cold saturated solution of arginine monoflavianate [2] and dried in an oven at 110° (Table II).

TABLE II

RECOVERY OF THE ARGININE MONOFLAVIANATE FOLLOWING SEMI-MICRO-PROCEDURE

WEIGHED AMOUNTS (mg)	AMOUNTS RECOVERED (mg)	ABSOLUTE DIFFERENCES	PER CENT DIFFERENCES
30.9	30.0	— 0.9	— 2.9
35.0	34.6	— 0.4	— 1.2
30.3	30.0	— 0.3	— 1.0
35.7	35.2	— 0.5	— 1.4
37.4	37.0	— 0.4	— 1.1
31.2	30.5	— 0.7	— 2.2
42.4	41.6	— 0.8	— 1.8
27.5	27.1	— 0.4	— 1.5
	Average.....	.....	— 1.7

Recrystallization of the monoflavianate in semi-micro scale: The arginine monoflavianate collected in appropriate bags of filter paper is transferred to small beakers, redissolved in 3 cc. of water + 0.3 cc. of 3N ammonium hydroxide, filtered in small Buchner and the beaker and the funnel washed with 3 portions of 1 to 2 cc. of water. The filtrate (7 to 10 cc.) is heated in a water bath and 0.3 cc. 3N HCl + 0.5 cc. glacial acetic added. The mixture is left overnight in the ice-box, after recrystallization of the arginine monoflavianate. The crystals are then collected in similar bags of filter paper (the weight of those made previously constant after 10 successive washings with distilled water and drying in an oven at 100° to 110°), washed twice with a saturated solution of arginine monoflavianate. After drying at 100° to 110°, the weight of the arginine monoflavianate is determined (Table III).

TABLE III

RECRYSTALLIZATION OF THE ARGININE MONOFLAVIANATE

WEIGHT OF THE SAMPLES (mg)	AMOUNTS RECOVERED (mg)	ABSOLUTE DIFFERENCES	PER CENT DIFFERENCE
30.0	29.0	— 1.0	— 3.3
34.6	33.9	— 0.7	— 2.0
30.0	29.4	— 0.6	— 2.0
35.2	34.4	— 0.8	— 2.3
37.0	36.3	— 0.7	— 1.9
30.5	30.7	— 0.2	— 0.6
41.6	40.9	— 0.7	— 1.7
27.1	26.5	— 0.6	— 2.2
	Average.....	.....	— 2.0

III. Estimation of arginine in pure solutions.

Semi-micro method: A weighed, dry sample (268.6 mg) of arginine monohydrocloride was dissolved in 25 cc. of water and pipetted into small Ehrlen-

[2] The saturated solution of arginine monoflavianate was prepared by agitating at room temperature an excess of twice recrystallized arginine monoflavianate in distilled water. The solution was filtred before using.

meyer flasks and 7 to 10 cc. of water added + 0.3 cc. of 3N ammonium hydroxide. The proper amount of a solution of flavianic acid was measured and poured into the hot solution of the arginine salt. An equivalent of 3N HCl (0.3 cc.) + 0.5 cc. of glacial acetic acid were added. The crystallization of golden plates

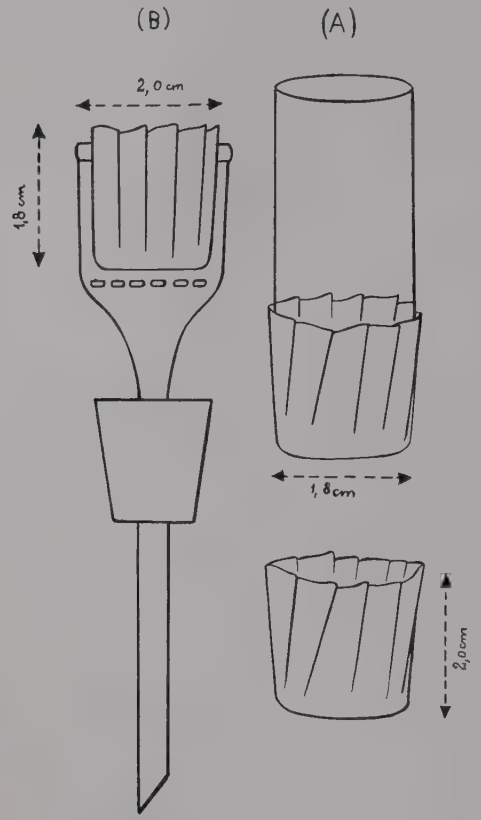


Fig. 1 — Manufacture of the small bags of filter paper for collecting the precipitate under semi-micro scale. To (B), suction is applied.

of the arginine monoflavianate starts very soon. The material is collected as indicated before, dried and weighed (Table IV).

TABLE IV

ESTIMATION OF ARGININE IN PURE SOLUTIONS (SEMI-MICRO PROCEDURE)

ARGININE MONO-HYDRO-CHLORIDE (mg)	FLAVIANIC ACID ADDED (mg)	MONOFLA-VIANATE RECOVERED (mg)	MONOFLA-VIANATE CORFECTED (mg + 2 %)	THEORY (mg)	DIFFERENCES %
10.74	50.0	24.4	24.9	25.0	— 0.4
10.74	50.0	24.6	25.1	25.0	+ 0.4
21.48	100.0	49.2	50.1	50.0	+ 0.2
21.48	100.0	48.2	49.2	50.0	— 1.6

Macro-method: Higher amounts of the arginine monohydrochloride were pipetted into 100 cc. Ehrlenmeyer flasks and 25 cc. of water + 1 cc. of 3N ammonium hydroxide were added. The solution is heated in a water bath and the proper amount of flavianic acid added. After 3 to 5 minutes, 1 cc. of 3N hydrochloric acid + 1 cc. glacial acetic acid are added. After standing overnight the precipitated arginine monoflavianate is collected in Gooch crucibles, dried and weighed. The results are presented in table V.

TABLE V

ESTIMATION OF ARGININE IN PURE SOLUTIONS (MACRO PROCEDURE)

ARGININE MONO-HYDRO-CHLORIDE (mg)	FLAVIANIC ACID ADDED (mg)	MONOFLA-VIANATE RECOVERED (mg)	MONOFLA-VIANATE CORRECTED (mg + 2 %)	THEORY (mg)	DIFFERENCES %
96.7	450.0	220.0	224.5	225.2	— 0.3
75.2	400.0	170.6	178.5	175.1	— 0.2

IV. Estimation of arginine in a mixture of amino acids.

Macro and semi-micro procedure: A dry, weighed sample of arginine monohydrochloride (0.8999 g.) was dissolved in a solution containing glycine (2.5 g.), l.leucine (0.7 g.), l.glutamic acid (0.6 g.), l.tyrosine (0.03 g.), l.cystine (0.02 g.) and l.histidine (0.1 g.). The final volume was made up to 100 cc. in a volumetric flask and samples of this solution were pipetted into Ehrlenmeyer flasks of increasing capacity (25 to 250 cc). Table VI shows the results obtained by employing the semi-micro (first six samples) and macro procedure (last four samples). As can be seen, there was a satisfactory agreement between the results obtained following both procedures. The figures at the last column were corrected for two crystallizations.

TABLE VI

ESTIMATION OF ARGININE IN A MIXTURE OF NATURAL AMINO ACIDS

AMOUNT OF THE SOLUTION (cc)	FLAVIANIC ACID ADDED (mg)	MONOFLA-VIANATE RECOVERED 1ST CRYST. (mg)	MONOFLA-VIANATE RECOVERED 2ND CRYST. (mg)	THEORY (mg)	MONOFLA-VIANATE (mg + 4 % CORRECT)
1.0	70.0	26.3	20.1	20.9	20.9
1.0	70.0	21.9	19.5	20.9	20.3
2.0	140.0	49.7	40.7	41.8	42.3
2.0	140.0	48.4	40.1	41.8	41.7
3.0	210.0	72.4	61.1	62.7	63.5
3.0	210.0	66.5	61.6	62.7	64.1
10.0	700.0	211.4	201.6	209.0	209.7
10.0	700.0	212.1	201.0	209.0	209.0
15.0	1050.0	327.0	301.5	313.5	313.6
15.0	1050.0	315.5	300.8	313.5	312.3

V. Estimation of arginine in gelatine.

The experiments presented below were performed with 2 different brands of commercial gelatine. Gelatine I, is a gelatine labelled "Anglo" and is prepared in São Paulo. Gelatine II, is a better grade granulated gelatine labelled "Dr. Meyer-Castens & Co. Hamburg".

The hydrolysis of the gelatine was performed as described above. Aliquots of the clear hydrolysate were pipetted into the experiment flasks after incomplete removal of HCl and decolorization with charcoal. Apropriate amounts of water (final volume 40 to 50 cc.) were added, the solution heated in a boiling water bath and the hot solution of flavianic acid was added with stirring. The crystallization of the mixture of flavianates follows almost instantaneously. The mixture is kept overnight in the ice-box and the precipitate is then collected in Gooch crucibles.

Estimation of arginine in gelatine I (macro procedure): In order to establish the optimal ratio between the amount of arginine to be estimated and the amount of flavianic acid to be added, varying amounts of flavianic acid were added to several samples of the gelatine hydrolysate which one corresponding to 5 g. of gelatine I. The weights of the precipitate in each sample were determined after collecting the crystals in Gooch crucible, drying at 110° to 120°, till constant weight. As shown in table VII, the amount of material obtained in the first crystallization is somewhat proportional to the flavianic acid added. At the second crystallization, however, there is a tendency of the weights to stabilize at a level corresponding to the values obtained in the flasks containing flavianic acid in the ratio 1.5/0.9 to the recovered monoflavianate. There is no advantage to use higher amounts of flavianic acid, since an excess of this would not improve the yield. Furthermore, the results referred to in table VII

TABLE VII

Estimation of arginine, as monoflavianate, in hydrolysates of gelatine I.

AMOUNT OF GELATINE I (g)	FLAVIANIC ACID ADDED (g)	FLAVIANATE RECOVERED 1ST CRYST. (mg)	MONOFLAVIANATE RECOVERED 2ND CRYST. (mg)	MONOFLAVIANATE RECOVERED 3RD CRYST. (mg)	AVERAGES
5.0	0.5	363	522	515	
5.0	0.5	564	524	511	
5.0	1.0	1.005	896	882	
5.0	1.0	999	894	880	
5.0	1.5	1.233	906	893	
5.0	1.5	1.262	904	894	893.5
5.0	2.0	1.920	908	894	
5.0	2.0	1.951	908	890	892.0
5.0	2.5	2.378	911	899	
5.0	2.5	2.322	921	902	900.0

Total average	895.5
+ 2 % correction for 2 crystal	931.3
Calculated for arginine base	332.5
Arginine in 100 g of gelatine I	6.6 g

show that for extracting arginine from gelatine, a ratio of 1.0/0.9 would be entirely satisfactory, as giving an excellent yield of monoflavianate. Fig. 2 shows the correlation between the amounts of flavianic acid used and the amounts of arginine monoflavianate recovered in the 2nd and 3rd crystallizations.

Estimation of arginine in gelatine II: 30 grams of gelatine II were left overnight in contact with a mixture of alcohol and ether. The next day the solvents were poured out and the gelatine dried at 70° in an oven. A sample of 8.523 g. of this dried gelatine was hydrolysed in presence of 80 cc. of con-

centrated HCl, during 8 hours under reflux. The excess HCl was removed as previously described and the volume of the clear hydrolysate was made up to 250 cc. Aliquots of this hydrolysate were transferred to Ehrlenmeyer flasks (25 to 250 cc.) and the arginine estimated through macro and semi-micro procedure. Table VIII shows the results obtained.

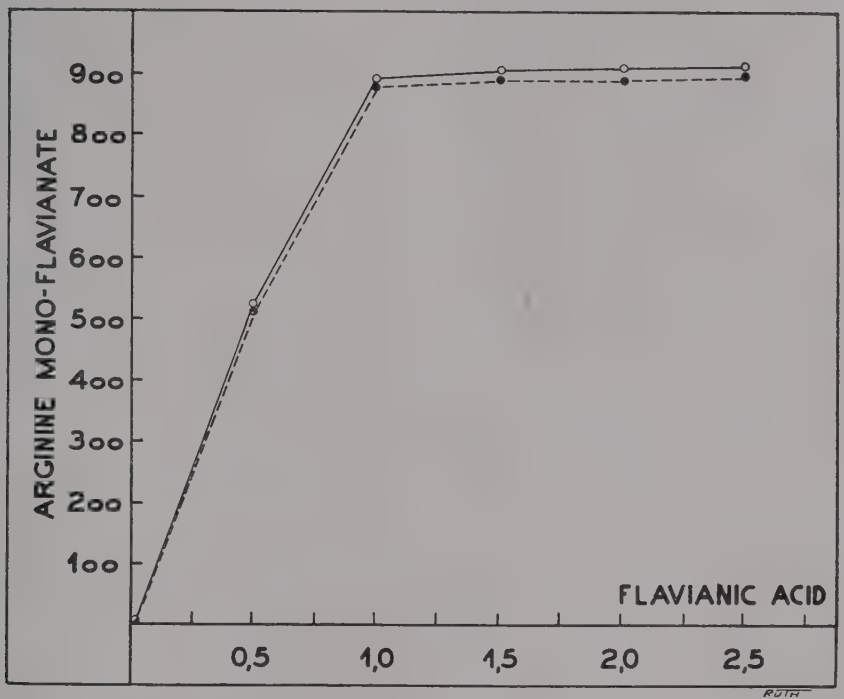


Fig. 2 — Correlation between the amounts of flavianic acid added and the amounts of arginine monoflavianate recovered in the 2nd (●———●) and 3rd (+----+) recrystallizations (Table VII)

As shown in the table there was a satisfactory agreement between the results obtained with the macro and the semi-micro procedure.

TABLE VIII

ESTIMATION OF ARGININE AS MONOFLAVIANATE, IN GELATINE II

AMOUNT OF GELATINE (mg)	FLAVIANIC ACID ADDED (mg)	ARGININE FLAVIANATE 1ST CRYST. (mg)	ARGININE MONOFLAVIANATE 2ND CRYST. (mg)	ARGININE BASE AFTER 2% CORRECT. (mg)	ARGININE IN % OF GELATINE
102.3	60.0	27.9	21.9	7.97	7.81
102.3	60.0	27.2	21.8	7.93	7.77
272.8	160.0	86.5	58.8	21.41	7.84
272.8	160.0	75.0	58.4	21.27	7.78
511.5	300.0	119.7	107.7	39.22	7.67
682.0	400.0	159.2	145.2	52.87	7.75
			Average		7.77

DISCUSSION.

The purpose of this paper has been to submit VICKERY's method of arginine estimation to further investigation, as well as to establish the proper amounts of reagents to be used in a routine arginine estimation in our laboratory. Our ultimate goal has been to apply this method for arginine estimations in living tissues. The original VICKERY's procedure is handicaped, as it can only be employed when one disposes of enormous amounts (15 to 20 grams) of fresh tissues, and it became necessary to work out a procedure of estimating arginine under semi-micro conditions.

For the physiological experiments which we have in mind to perform, a fairly accurate method for arginine determination will be entirely satisfactory, since one has to compare results obtained with different tissues, rather than to estimate the actual arginine content of each one separetely. There is no doubt that the flavianic acid method will fulfill those requirements, since one can estimate accurately the arginine content of a few hundred mg. of a dried protein, with a satisfactory approximation.

The method can not be used under strictly micro conditions, as for estimating free arginine in tissue deproteinized filtrates. For this purpose other methods are available. When sodium hypochloride is added to an alkaline solution of arginine, in presence of α-naphtol there develops a red color (SAKAGUCHI, 7). This qualitative color test was developed into a quantitative procedure for arginine estimation by WEBER (8,9) and JORPES & THORÉN (10), who have substituted sodium hypobromite for the hypochloride as used in the original SAKAGUCHI's procedure. Many substances present in biological fluids or in protein hydrolysates can falsh the results obtained with WEBER's procedure. The SAKAGUCHI test is positive with monosubstituted guanidines such as methylguanidine or glycocyamine ; it is also positive with symetrically di- and trisubstituted guanidines as *sym*-dimethylguanidine and *sym*-trimethylguanidine, but not with guanidine itself (POLLER, 11). Recently, DUBNOFF (12) obviated to this difficulty by working out a method of separating arginine (through permutit selective adsorption) from glycocyamine. The separated arginine is eluted from the permutit and determined colorimetrically through a modification of WEBER's procedure. If it is true that DUBNOFF's procedure can give reliable results in clear tissue and blood FOLIN & WU filtrates, there is still lacking data on the applicability of the method protein hydrolysates.

For this purpose, reliable and accurate data can be gathered through the beautiful method developed by HUNTER & DAUPHNEE (13) and by KIECH, LUCK & SMITH (14) who have employed an enzymatic

extract of rabbits liver (arginase) to convert arginine into urea and ornithine. Urea was further decomposed by urease and the ammonia estimated. This method, however, is time consuming, involving two pH adjustments and an estimation of several different blanks. It finally allows an estimation of arginine with 98.5% approximation, due to the enzyme-substrate equilibrium. Even the simplification introduced by GRAFF *et al.* (15) consisting in estimating urea by Fosse's xanthydrol method involves so many manipulations and blank determinations that it cannot compete with the flavianic acid method described above, either in simplicity or in accuracy for semi-micro determinations of arginine (7 to 8 mg.).

RESUMO

O MÉTODO DO ÁCIDO FLAVIÂNICO PARA EXTRAÇÃO E DOSAGEM DA ARGININA

O ácido flaviânico (ácido 2,4.dinitro α-naftol 7.sulfônico) foi usado por KOSSEL & GROSS (1924) para extrair arginina de hidrolisados de proteinas. Recentemente, VICKERY (1940) desenvolveu um método de dosagem da arginina em hidrolisados de proteinas, usando o ácido flaviânico. Segundo o método de VICKERY, a arginina é precipitada primeiramente, sob a forma de diflavianato, em meio fortemente ácido. Em seguida, o diflavianato é redissolvido em meio amoniacal e o monoflavianato obtido, sob forma cristalina, em condições rigorosamente estipuladas. Segundo VICKERY, os cristais de monoflavianato são obtidos em meio ligeiramente acidificado pelo HCl e a quantidade final de monoflavianato, não deve ser inferior a 500 mg.

No presente trabalho, o método de VICKERY foi seguido até a redissolução do diflavianato de arginina, em meio alcalinizado pelo amoníaco. A neutralização do monoflavianato, foi realizada a quente, pela adição de um excesso de ácido acético glacial. Verificamos que um excesso de ácido acético glacial (evitando qualquer excesso de ácido mineral) permite uma melhor e mais rápida cristalização do monoflavianato e portanto maior precisão nos resultados. Com essa modificação introduzida no método de VICKERY, foi possivel desenvolver um semi-micro método de dosagem da arginina, com o qual foi possível recuperar quantidades de arginina compreendidas entre 7 e 20 mg., portanto cerca de 10 a 15 vezes menores do que as determinadas por VICKERY. Foi possível ainda, com o uso do semi-micro método por nós descrito, determinar a quantidade de arginina contida em 100 mg. de gelatina, e obter resultados inteiramente concordantes com os obtidos com quantidades 5 vezes maiores de gelatina.

O método do ácido flaviânico, de extração da arginina, a partir da gelatina, foi rigorosamente trabalhado em nosso laboratório. Depois de numerosos ensaios, decidimos introduzir algumas modificações no método de KOSSEL & GROSS. Numa primeira fase, é obtida uma mistura impura de diflavianatos e monoflavianatos, em meio fortemente ácido e em volume relativamente pequeno de líquido. Essa mistura de flavianatos é em seguida recristalizada, sob condições apropriadas, de maneira a se obter o monoflavianato de arginina, sob forma purificada (o brilho dourado dos cristais é uma excelente indicação da pureza do monoflavianato). A transformação do monoflavianato de arginina em monoclorhidrato, se faz de maneira quantitativa e o produto obtido apresenta um elevado grau de pureza.

BIBLIOGRAPHY

1. KOSSEL, A. & GROSS, R. E., 1924. Uber die Darstellung und quantitative Bestimmung des Arginins. *Z. Physiol. Chem.*, 135: 167-174.
2. PRATT, A. E., 1926, The preparation of d.arginine carbonate. *J. Biol. Chem.*, 67: 351-356.
3. COX, G. J. , 1928, The preparation of d.arginine monohydrochloride. *J. Biol. Chem.*, 78: 475-479.
4. LIEBEN, F. & LIEBER, H., 1935, Über die Abspaltung von Arginin aus Eiweissverband durch Fermente. *Biochem. Z.*, 275 : 38-48.
5. VICKERY, H. B., 1940, The determination of arginine by means of flavianic acid. *J. Biol. Chem.*, 132 : 325-342.
6. BRAND, E & SANDERS, M., 1932, d. Arginine hydrochloride, *In Organic Synthesis*, 12: 4-9. John Wiley & Sons, Inc., New York.
7. SAKAGUCHI, S., 1925, *J. Biochem.* (Japan) 5 : 25. *Cited in* Weber (1930).
8. WEBER, C. J., 1930, A modification of Sakaguchi's reaction for the quantitative determination of arginine. *J. Biol. Chem.*, 86 : 217-222.
9. WEBER, C. J., 1930, The determination of arginine in dog blood. *J. Biol. Chem.*, 88 : 353-359.
10. JORPES, E. & THORÉN, S., 1932, The use of Sakaguchi reaction for the quantitative determination of arginine. *Biochem. J.*, 26 : 1504-1506.
11. POLLER, K., 1926. *Ber. Chem. Ges.*, 59, 1927. *Cited in* Weber (1930).
12. DUBNOFF, J. W., 1941, A micro-method for the determination of arginine. *J. Biol. Chem.*, 141 : 711-716.
13. HUNTER, A. & DAUPHNEE, J. A., 1930, The arginase method for the determination of Arginine and its use in the analyses of proteins. *J. Biol. Chem.*, 85 : 627-665.
14. KIECH, V. C., LUCK, J. M. & SMITH, A. E., 1930, Studies on Arginine. I. The rate of catobolism of arginine in rats, including a method for the determination of arginine in biological material. *J. Biol. Chem.*, 90 : 677-696.
15. GRAFF, S., MACULLA, E. & GRAFF, A. M., 1937, The composition of the tissue proteins. II. The estimation of arginine. *J. of Biol. Chem.*, 121 : 71-77.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):63-67
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

NOTA SÔBRE A MORFOLOGIA DAS ADRENAIS DOS OFÍDIOS [1]

LUIZ CARLOS UCHÔA JUNQUEIRA
Instituto Butantan, São Paulo

(Com 7 figuras no texto)

O estudo morfológico das adrenais dos ofídios se justifica não só pelo interesse da Anatomia Comparada mas ainda pela escassez de dados na Literatura e como introdução indispensavel a pesquisas de natureza fisiológica.

RADU (1) estudou as suprarrenais dos reptis examinando entre os ofídios a *Coronella austriaca* e a *Tropidonotus natrix*. BOURNE (2) cuidou da filogenia das adrenais e LAWTON (3) da sua morfologia nos crocodilianos. VALLE & SOUZA (4) examinaram resumidamente as adrenais dos ofídios dos gêneros *Tomodon* e *Dryophylax* mostrando sua grande variação ponderal.

MATERIAL E MÉTODO

As nossas observações foram feitas em 20 serpentes ovíparas colubrídeas do gênero *Philodryas*, designadas vulgarmente "parelheiras". Os animais eram sacrificados ou anestesiados com Dial "Ciba" 0.2 cc. por 100 g. de peso, estudada a disposição anatômica e conservadas as adrenais para o estudo histológico.

Usamos como fixadores o formol fisiológico a 10% ou os líquidos de Hally e Bouin. Em alguns casos a fixação foi feita em ácido ósmico. Inclusão em parafina, cortes de 7 micra e colorações pela hematoxilina e eosina, Van Gieson e Mallory.

ANATOMIA

As adrenais da "parelheira" são formações pares, alongadas, de forma cilíndrica e de côr vermelho-rósea. Estão colocadas ao lado dos ovários nas fêmeas e dos testículos nos machos, em níveis diferentes, a direita mais cranial e ambas dispostas horizontalmente no sentido crânio-caudal (fig. 1). O tama-

[1] Recebido para publicação a 28 de Fevereiro de 1944.
Trabalho da Seção de Endocrinologia do Instituto Butantan, apresentado à Sociedade de Biologia de São Paulo em 8-10-1943.

nho é variavel: de 7 a 23 mm. de comprimento por 2 a 4 mm. de espessura. O peso oscila entre 27 e 63 mg. por 100 g. de peso corporal.

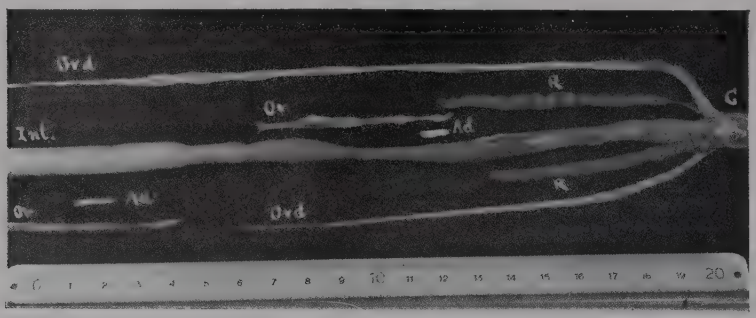
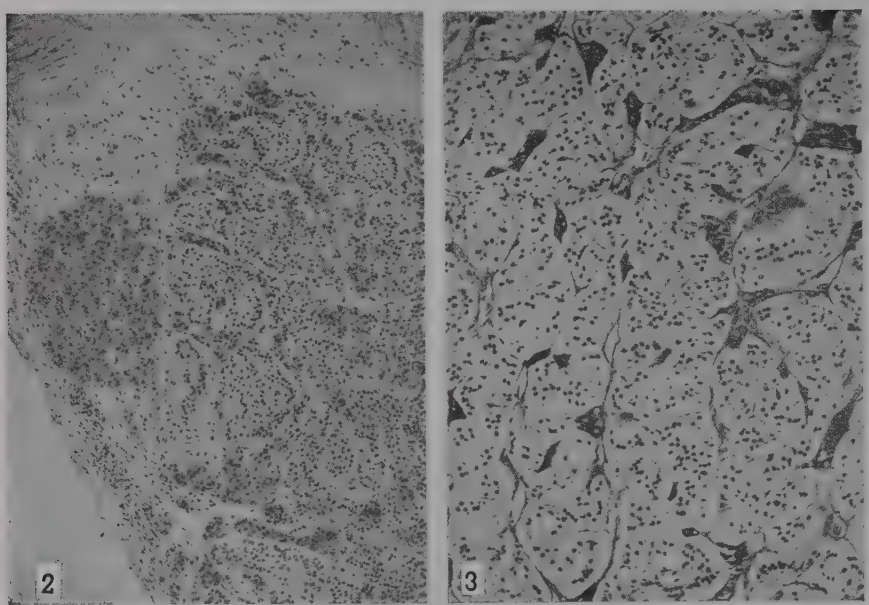


Fig. 1 — Fotografia das vísceras isoladas de uma "parelheira" fêmea (*Phylodryas* sp.) mostrando as relações das adrenais (Ad) com os ovários (Ov), o intestino (Int) e os ovidutos (Ovd). C-cloaca. R-rins.

É um orgão bem vascularizado recebendo geralmente um ramo direto da aorta. A irrigação venosa é interessante, havendo um sistema porta suprarrenal



Adrenal de "parelheira" — Fig. 2: cápsula conjuntiva envolvente e acúmulo de células cromoafins no polo superior da glândula (Hem. Eos., 82x); fig. 3: cordões de células lipoidógenas claras envoltos por escasso tecido conjuntivo, de permeio células cromoafins e vasos (Hem. Eos., 136x).

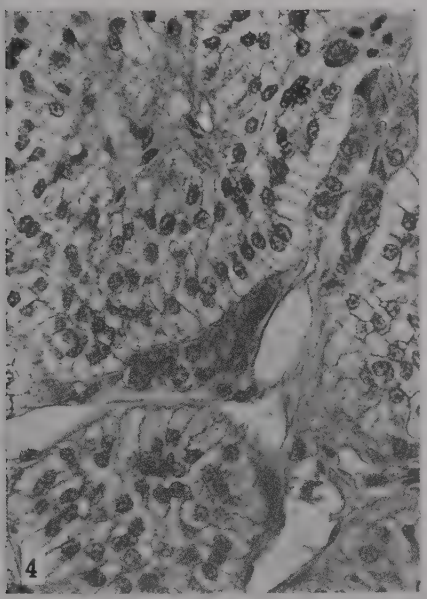
análogo ao descrito por Ray (5) na *Ptyas mucosus* e estudado na boipeva neste Laboratório por Fausto Figueira de Mello (6). As veias aferentes se originam

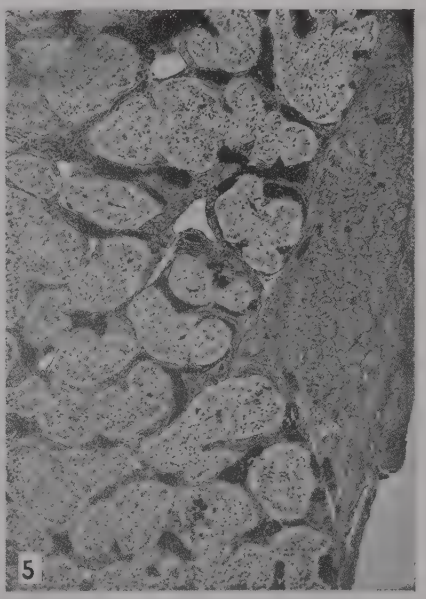
principalmente na parede dorsal e recebem porisso o nome de veias parietais. As veias eferentes, em número de 4 a 8, são curtas e partem do bordo medial das adrenais e desembocam, as da adrenal direita na cava caudal e as da adrenal esquerda na cava caudal ou na veia eferente renal esquerda, ou em ambas.

Na "parelheira", ao contrário do que pode ocorrer na giboia, segundo a observação de BOURNE, e que pudemos comprovar, as adrenais não entram em contacto direto com os rins.

HISTOLOGIA

As adrenais são envolvidas por uma cápsula conjuntiva (fig. 2) dentro da qual se dispõem de maneira característica os seus elementos constituintes: as células lipoidógenas, as células cromoafins e os simpatoblastos, três tipos celulares já descritos por RADU (1).





Adrenal de "parelheira" — Fig. 4: células intersticiais cromoafins entre os cordões de células lipoidógenas (notar o acúmulo de células cromoafins na periferia da glândula) (Mallory, 136x); fig. 5: cordões lipoidógenos com células colunares na periferia e arredondadas ou poliédricas no centro (notar o aspecto vacuolar do protoplasma) (Hem. Eos., 420x).

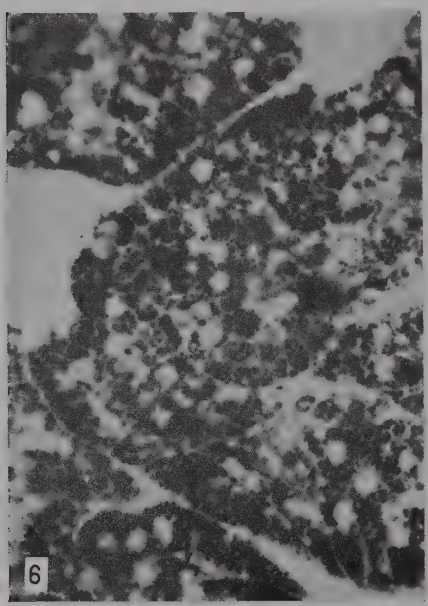
As *células lipoidógenas* se agrupam em cordões envoltos por escasso tecido conjuntivo; são os cordões lipoidógenos. Estas células se apresentam, quando fixadas em Bouin e coradas pela hematoxilina-eosina, de contornos irregulares mas bem delimitados (figs. 3 e 4). Têm núcleos redondos ocupando uma posição mais ou menos central e 1 a 2 nucléolos. O citoplasma se apresenta intensamente vacuolizado devido ao acúmulo de lipóides no seu interior.

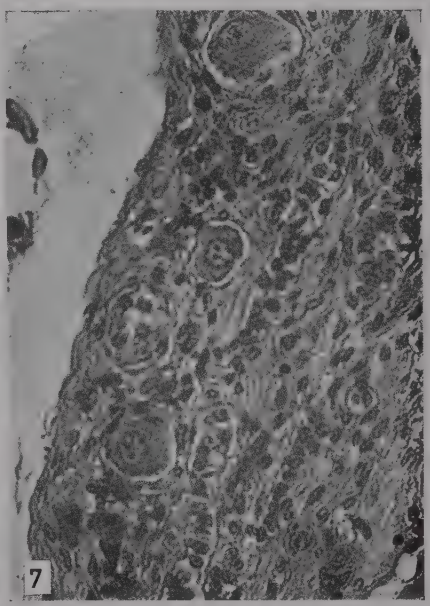
A forma destas células lipoidógenas varia conforme estejam colocadas na periferia ou no centro dos cordões. Comumente as periféricas são colunares e as

centrais poliédricas ou arredondadas (fig. 4). O tamanho destas células é variavel: 16 a 32 μ de comprimento e 6 a 10 μ de largura para as células colunares e 6 a 14 μ de diâmetro para as células centrais.

Na figura 6, obtida de corte tratado pelo ácido ósmico, pode se ver muito bem em preto os grânulos de lipóides de diversos tamanhos.

As *células cromoafins* são grandes e se encontram de regra com os vasos no interstício dos cordões lipoidógenos. Elas apresentam forma variavel, de contornos pouco nítidos, têm núcleo redondo mais ou menos central e 1 a 2 nucléolos (figs. 3-6). Medem de 14 a 24 μ de comprimento por 8 a 14 μ de largura. O citoplasma é bem granuloso e apresenta afinidades corantes comparaveis às células cromoafins das adrenais dos mamíferos. Além da posição intersticial estas células cromoafins se dispõem também na periferia da glândula formando aglomerados que podem mesmo representar o maior contingente delas nas adrenais (figs. 2 e 5). Esta disposição periférica e intersticial dos elementos cromoafins é interessante por representar um grau intermediário entre os peixes e os mamíferos.





Adrenal de "parelheira" — Fig. 6: notar nas células dos cordões as gotículas de lipóides em preto e os núcleos brancos, as células cromoafins intersticiais não estão coradas (Acido ósmico, 420x); fig. 7: cápsula, mostrando três simpatoblastos (Hem. Eos. 430x).

Os *simpatoblastos* têm estrutura característica, são raros e se encontram de regra na cápsula conjuntiva da glândula (fig. 7). São redondos, com núcleo grande e citoplasma homogêneo.

Em resumo, as adrenais da "parelheira" são orgãos alongados, próximos às gonadas e constituidos de três tipos de células: lipoidógenas dispostas em cordões, cromoafins intersticiais e formando aglomerados periféricos, e simpatoblastos raros e encontrados de regra na cápsula conjuntiva glandular.

SUMMARY

A morphological study of the adrenal glands of snakes belonging to the genus *Philodryas* was made. The adrenals of these Ophidia are elongated organs near the gonads and containing three kinds of cellular elements : cords of lipoidogenic cells ; chromoaffine cells, interstitial and aggregated also at the periphery of the gland ; and rare sympathoblasts usually found in the capsular tissue.

BIBLIOGRAFIA

1. RADU, V. C., 1934, Les glandes surrénales des reptiles. *Ann. Sci. Univ. Jassy*, 19 : 378-381 (*in Ber. Wiss. Biol.*, 31 : 42. 1935).
2. BOURNE, G, 1936, The phylogeny of the adrenal gland. *Amer. Nat.*, 70 : 159-178.
3. LAWTON, F. E., 1937, The adrenal-autonomic complex in *Alligator mississippiensis*, *J. Morphol.*, 60 : 361-378.
4. VALLE, J. R. & SOUZA, P. R., 1942, Observações sôbre o sistema endócrino dos ofídios. *Rev. Brasil. Biol.*, 2: 81-88.
5. RAY, H. C., 1936, On the venous system of the common Indian rat-snake *Ptyas mucosus* (Linn.). *J. Morphol.*, 59 : 517-544.
6. MELLO, F. F., 1943, A irrigação venosa da suprarrenal da boipeva (*X. merremii*). Com Seção Endocrinologia do Inst. Butantan (dados pessoais).

Rev. Brasil. Biol., 4(1):69-80
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

LES OXYDATIONS INDÉPENDANTES DES SYNTHÈSES DANS LE MÉTABOLISME [1]

RENÉ WURMSER
Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, D. F.

Malgré la diversité des réactions dont l'ensemble constitue le métabolisme, et des facteurs qui déterminent leurs vitesses, les données énergétiques font apparaitre des relations susceptibles d'une interprétation physiologique. Les faits essentiels concernant le rôle des oxydoréductions réversibles dans le maintien de la composition chimique des cellules ont été déjà exposés (1,2). Ils seront rappelés ici parce qu'ils assignent une fonction à cette part considérable du métabolisme que j'ai désignée par le terme d'oxydations indépendantes. En outre la nature des substances entrant dans ces réactions dépend, dans une large mesure, des équilibres d'oxydoréduction intracellulaires.

I. EQUILIBRES DANS LES PREMIERS STADES D'OXYDATION

Le tableau I donne pour quelques systèmes, le potentiel d'oxydoréduction, exprimé en volts, à pH 7, et 37° C, quand les rapports (acide cétonique) (ammoniaque)/(aminoacide) ou (-CHOH)/(-CH_2) sont égaux à l'unité, les termes entre parenthèses représentant les concentrations totales des substances, et les écarts entre concentrations et activités étant négligés.

Les valeurs de ces potentiels sont telles que l'équilibre de tous ces systèmes correspond à des rapports de concentrations tout-à-fait admissibles, dans les cellules, pour les acides aminés et les premiers produits de leur oxydation (acides cétoniques et ammoniaque) ainsi que pour les acides gras et les hydroxyacides correspondants. Ces substances peuvent être en équilibre non seulement entre elles, mais avec le système oxydoréducteur qui détermine le potentiel intracellulaire. Ainsi

[1] Reçu le 2 Mars 1944

la composition des cellules, leur teneur relative en certains protides et lipides, peut etre constante par le seul fait qu'un même état d'oxydoréduction convient pour favoriser la synthèse des deux sortes de constituants.

TABLEAU I

Système oxydoréducteur	E (volts)
$CH_3 . CH . \overset{+}{N}H_3 . \overset{-}{C}OO + H_2O \rightleftharpoons CH_3 . CO . \overset{-}{C}OO + \overset{+}{N}H_4 + 2\overset{+}{H} + 2e$	— 0,080 (3)
$\overset{-}{O}OC . CH_2 . CH_2 . CH . \overset{+}{N}H_3 . \overset{-}{C}OO + H_2O \rightleftharpoons \overset{-}{O}OC . CH_2 . CH_2 . CO . \overset{-}{C}OO + \overset{+}{N}H_4 + 2\overset{+}{H} + 2e$	— 0,080 (3)
$(CH_3)_2 . CH . CH . \overset{+}{N}H_3 . \overset{-}{C}OO + H_2O \rightleftharpoons (CH_3)_2 . CH . CO . \overset{-}{C}OO + \overset{+}{N}H_4 + 2\overset{+}{H} + 2e$	— 0,116 (4)
$-\overset{|}{C}H_2 + H_2O \rightleftharpoons \overset{|}{C}HOH + 2\overset{+}{H} + 2e$	appr. 0 (5)
Potentiel intracellulaire (en aérobiose)	— 0,050 (2)

Toutefois cette manière de voir implique deux assertions qui doivent être examinées : l'une relative à la nature des réactions envisagées au début de l'oxidation des protides et des lipides, l'autre concernant la signification du potentiel d'oxydoréduction intracellulaire.

a) *Nature des premiers stades d'oxydation* — Il est admis que les aminoacides s'oxydent en acides cétoniques et ammoniaque. Quant aux acides gras, il est peu vraisemblable que leur oxydation donne d'emblé des cétoacides. S'il en était ainsi, le potentiel correspondant au système acide gras $\rightleftharpoons$ acide oxydé serait, à pH 7, voisin, non pas de 0, mais de -0,15 volts, ce qui est la valeur que l'on peut estimer pour le potentiel du système :
$CH_3.CH_2.CH_2.COO^- + H_2O \rightleftharpoons CH_3.CO.CH_2.COO^- + 4H^+ + 4\ e$,
quand le rapport des concentrations des acides butyrique et acétoacétique est égal à I. Ce qui rend extrèmement improbable cette réaction est la perte simultanée de 4 atomes d'hydrogène, et il est légitime d'admettre la formation préalable de l'hydroxyacide.

b) *Signification du potentiel intracellulaire* — Ce potentiel est mesuré en notant l'indicateur qui reste partiellement oxydé à l'interieur d'une cellule. La valeur trouvée dans les cellules normalement aérées, -0,50 volts, est très voisine du potentiel de demi-réduction de la protéoflavine de Warburg et Christian, qui conduit vers le cytochrome l'hydrogène de nombreux donateurs, en particulier du triosephosphate. En outre le titrage électrométrique d'un suc de macération de levure mon-

tre que la protéoflavine représente dans la cellule un tampon d'oxydoréduction (5). On est donc fondé à penser que le potentiel mesuré au moyen des indicateurs correspond à un equilibre protéoflavine ⇌ hydroprotéoflavine, qu'il renseigne sur l'état de réduction de la chaîne des transporteurs, tout au moins de ceux qui réagissent rapidement avec les indicateurs. [2] Si les protéoflavines sont à demi réduites, les cytochromes sont statistiquement presque complètement à l'état de complexes ferreux ; inversement la cozymase est presque totalement oxydée, dans les conditions normales d'aération des cellules aérobies. De la sorte, le potentiel intracellulaire permet de prévoir le sens des réactions liées à la chaîne de transporteurs d'hydrogène, pourvu que ceux-ci figurent dans les réactions comme constituants des équilibres, c'est-à dire fonctionnent vraiment comme transporteurs et non comme coenzymes.

A ce point de vue, il serait très désirable de connaître la manière dont les aminoacides et les acides gras sont reliés à la chaîne des transporteurs. Dans le cas des acides gras les travaux de Munoz & Leloir (8) et de Leloir (9) montrent que leur oxydation est catalysée par le fumarate et le phosphoénolpyruvate. On verra plus loin que ces corps sont en equilibre d'oxydoreduction, à pH 7, précisément quand le potentiel est voisin de zéro. Un transport d'hydrogène des acides gras par leur intermediaire rentrerait donc dans la règle qui assigne au système catalytique un potentiel voisin de celui du système catalysé. Mais on ne peut rien dire sur le rattachement éventuel de ces systèmes à la chaine de transporteurs protéoflavine-cytochrome.

On sait par contre que si, dans les extraits isolés, l'enzyme qui catalyse l'oxydation des d-aminoacides, et dont le groupe prosthétique est un dinucléotide de flavine adénine, produit la réaction directe avec l'oxygène, il n'en est pas de même dans les bactéries possédant des cytochromes ; là, le cyanure inhibe l'oxydation, il y a donc liaison avec les transporteurs.

Il suffit que dans ce cas au moins, celui de l'oxydation des aminoacides, il y ait rattachement à la chaine des transporteurs pour que la stabilité du potentiel intracellulaire ait une signification physiologique. Il faut ajouter qu'en plus des oxydations produisant la désamination des protides hydrolysés, il en est d'autres portant sur des groupes actifs de protides, et qui en modifient ou suppriment certaines propriétes spécifiques. On peut donc conclure que le maintien du potentiel intracellulaire à sa valeur normale constitue une veritable fonction.

---

[2] Il y a dans les cellules d'autres niveaux d'oxydoréduction, correspondant à d'autres systèmes en équilibre, par exemple celui du glutathion, mais ne réagissant pas aussi rapidement avec la chaine de transporteurs, ou tout au moins avec les indicateurs.

II. LES GLUCIDES, MÉTABOLITES PRÉFÉRENTIELS

L'ensemble des systèmes oxydoréducteurs en équilibre contribue à exercer un effet tampon sur les variations momentanées du potentiel, mais l'etat stationnaire de ces systèmes dépend en définitive de réactions irréversibles. Il résulte de la compétition entre la réduction des transporteurs par les métabolites et leur oxydation par les accepteurs, en particulier par l'oxygène chez les êtres aérobies. A ce point de vue les glucides, dans un autre sens que celui donné par RUBNER, sont des aliments préférentiels pour la raison suivante :

Au contraire de ce qui se passe pour les acides gras et aminés, l'oxydation des glucides débute par une réaction correspondant à une forte diminution d'energie libre, donc à un très bas potentiel. Le passage du triosephosphate à l'acide phosphoglycérique est une oxydation d'aldéhyde en acide. L'exemple de l'acétaldehyde fixe un ordre de grandeur. Compte tenu de la neutralisation, c'est-à-dire pour une activité des ions H^+ égale à 10^{-7}, la réaction :

$$CH_3.CHO + H_2O \rightleftharpoons CH_3COO^- + 3\ H^+ + 2\ e$$

a un potentiel de -0,60 volts à 25° C.

Le potentiel du système phosphoglycéraldéhyde $\rightleftharpoons$ acide phosphoglycérique est toutefois plus élevé. On sait en effet que la réaction :

lactate + phosphoglycérate + adénosinetriphosphate $\rightleftharpoons$ pyruvate + phosphoglyceraldehyde + adénosinediphosphate + phosphate

est réversible (9). Or le système :

$$CH_3.CHOH.COO^- \rightleftharpoons CH_3.CO.COO^- + 2\ H^+ + 2\ e$$

a, à pH 7, quand le rapport des concentrations (lactate)/(pyruvate) est egal a l'unite, un potentiel de 0,175 volts (II). L'oxydation du lactate en pyruvate ne pourrait donc compenser la reduction de l'acide phosphoglycérique en phosphoglycéraldehyde si le potentiel correspondant à cette réduction etait aussi bas que -0,60, même en tenant compte des très basses concentrations des produits de la réaction, dans les conditions où l'expérience a été faite, c'est-à-dire en présence de cyanure. Ainsi que LIPMANN l'a indique (12), la déphosphorylation du groupe carboxylique de l'acide phosphoglycerique entraine une diminution d'énergie libre de 10000 calories, soit une élévation du potentiel de 0,22 volts.

Même ainsi le potentiel que l'on peut affecter au système phosphoglycéraldehyde—acide phosphoglycerique reste très bas, environ -0,38 volts si on le compare a ceux des premiers stades d'oxydation des acides gras et aminés. En conséquence les glucides, dans une large mesure, protègent de la combustion les lipides et les protides. Une fois établi le régime de vitesse de reduction et d'oxydation des divers transporteurs, les glucides, dont le premier stade d'oxydation correspond à un

très bas potentiel, constituent, par cela même, des donateurs d'hydrogene privilegies, les acides gras et aminés s'oxydant seulement a la péripherie des cellules où le potentiel doit être plus elevé. Cette protection par les glucides n'exclut pas leur intervention dans les stades ultérieurs de l'oxydation des acides gras, une fois celle-ci déclenchée.

Ce qui montre bien la prédominance des glucides sont les variations expérimentales du potentiel intracellulaire. En principe, on peut pour les obtenir agir sur l'un ou l'autre bout de la chaine des transporteurs. La vitesse de réduction dépend généralement des quantités de déshydrases présentes, les enzymes travaillant à saturation. On sait par exemple que l'accroissement de métabolisme produit par une addition de thyroxine est attribué à un accroissement des actions deshydrasiques, et que la diminution du métabolisme en présence des narcotiques est due à l'inhibition des déshydrases. Mais il est beaucoup plus aisé d'agir sur l'autre extremité de la chaine des transporteurs, en supprimant l'arrivée de l'oxygène et par conséquent l'oxydation du cytochrome, dans les cellules aérobies.

On observe que le potentiel intracellulaire de ces cellules maintenues dans une atmosphère d'azote passe graduellement de -0,050 a -0,25 volts (13). Or, dans ces conditions, le métabolisme des glucides consiste dans une production d'acide lactique, par réduction d'acide pyruvique. La concentration de ce dernïer étant à tout instant extremement faible, le potentiel que l'on doit s'attendre à trouver dans les cellules est le potentiel limite inférieur du système lactate $\rightleftharpoons$ pyruvate, soit une valuer voisine de -0,2 volts.

De la même manière, dans les cellules végétales le potentiel intracellulaire, dans l'azote, atteint le limite -0,25 volts, correspondant au potentiel limite inferieur du système alcool éthylique $\rightleftharpoons$ acetaldehyde.

III. OXYDATIONS LIÉES AU TRAVAIL PHYSIOLOGIQUE ET OXYDATIONS INDÉPENDANTES

Parmi les oxydations qui se font dans les organismes, on en distingue deux sortes. Les unes sont liées à des transferts d'énergie utilisée à un travail physiologique. Les autres sont indépendantes de tout transfert utilisée.

Le travail physiologique peut être mécanique ou se manifester par des synthèses de constituants cellulaires, ou par des concentrations de substances : il implique toujours des transferts d'énergie chimique par échange d'hydrogène ou de groupes dont l'introduction dans une molécule accroit son energie libre.

Considérons par exemple la suite de réactions impliquées dans la resynthèse des glucides, parce qu'elle est la mieux connue. Le tableau II les résume. Dans ces évaluations de potentiel qui y figurent, l'énergie

libre de l'hydrolyse des composés phospho-organiques est celle qu'a admise LIPMANN (12) chaque fois que le reste de phosphate est lié à un autre phosphate, à un carboxyle, ou à un énol acide, soit-10000 calories par molécule gramme. Seulement pour l'hydrolyse du phosphoénolpyruvate, on a utilisé la valeur plus précise de -11000 calories, qui correspond d'ailleurs à l'hydrolyse proprement dite, plus la cétonisation de l'énol. Les activités des ions H^+, HCO_3^- et $HPO_4^=$ sont, respectivement : 10, 0,04 et 10 ; les activités des autres constituants sont égales a 1.

TABLEAU II

		E (volts)
	$\longleftarrow 2\,H^+ + 2\,e$	
1.	$2\,CH_3 . CHOH . COO^- \rightarrow 2\,CH_3 . CO\ COO^- + 2\,H^+ + 2\,e$	— 0,175
2.	$2\,CH_3 . CO . COO^- + 2\,H_2O + 2\,H\,PO_4^= \rightarrow$ $2\,H\,CO_3^- + 2\,CH_3 . C(=O) . O . PO_3^= + 4\,H^+ + 4\,e$ (acétylphosphate)	— 0,48
3. cozymase	$2\,CH_3 . C(=O) . O . PO_3^= + 2\,ad . O . P(O^-)(O^-) . O . P(O^-)(O^-) . O . P(O^-)(O^-) \rightarrow 2\,ad . O . P(O^-)(O^-) . O . P(O^-)(O^-) . O . P(O^-)(O^-) . O^- +$ (adénosine triphosphate) $^-OOC . CH : CH . COO^- + 4\,H^+ + 4\,e$ (fumarate)	0
4.	$^-OOC . CH : CH . COO^- + H\,PO_4^= + H_2O \rightarrow H\,CO_3^- +$ $CH_2 : C(O\,P\,O^-\,O) . COO^- + 2\,H^+ + 2\,e$ (phosphoénolpyruvate)	+ 0,09
5.	phosphoénolpyruvate → phosphoglycérate	

6. cozymase réduite + phosphoglycérate + adénosinetriphosphate → cozymase + phosphoglycéraldéhyde + adénosinediphosphate + phosph.

7. phosphoglycéraldéhyde → hexosediphosphate

8. hexosediphosphate → glycogène + phosph.

Cette suite de réactions présente 3 types de transfert d'énergie provenant d'une oxydation.

a) 2 H provenant de la réaction 1 réduisent la cozymase qui réduit a son tour le phosphoglycérate dans la reaction 6. Le transfert d'énergie se fait par transport d'hydrogène (ou d'électrons).

b) Les 12 autres H, dont 6 proviennent du lactate et 6 de l'eau, se combinent finalement avec l'oxygène moléculaire. Au cours de cette combustion incomplète une partie de l'énergie libre des oxydations compense la formation de substances dont la synthèse correspond à un accroissement d'énergie libre — le phosphoénolpyruvate et l'adénylpolyphosphate (reactions 3 et 4). Dans la réaction 2 la phosphorylation de l'acétate est egalement rendue possible par une oxydation, mais dans ce cas, le potentiel est si bas que la combinaison avec l'oxygène libre ou quelque autre accepteur ne serait pas nécessaire. [3]

On doit remarquer que, même dans les réactions 3 et 4, le transfert d'énergie ne se fait pas aux dépens de la réduction de l'oxygène libre, mais aux dépens de la réduction d'accepteurs intermediaires, de potentiel moins élevé que celui de l'oxygène.

c) L'adénosinetriphosphate formé dans la réaction 3 s'hydrolyse dans la réaction 6 ; la diminution d'énergie libre qui en résulte contribue à rendre possible la réduction du phosphoglycéraldehyde. Il y a là un de ces transferts d'énergie par les groupes phosphate bien mis en évidence par LIPMANN.

Il faut maintenant observer que la signification du métabolisme dépend de l'importance relative non pas des réactions avec et sans transfert d'énergie, mais des réactions avec et sans transfert d'énergie utilisée pour du travail physiologique. Ainsi les oxydations liées à une resynthèses de glucides ne seront comptées parmi les oxydations liées aux synthèses (physiologiques) que si il y a reconstitution de composés spécifiques usés par le fonctionnement de la cellule. En outre les deux sortes d'oxydations, chimiquement parlant, ne peuvent pas être décrites séparément. Par exemple tous les métabolites qui réduisent la cozymase participent indistinctement aux hydrogénations efectuées par le reste de la chaîne des transporteurs, que ces hydrogénations servent à des synthèses assimilatrices, ou qu'elles aboutissent à des produits de fermentation. Enfin la dégradation d'un métabolite donné est utilisée dans certains stades, et complètement indépendante dans d'autres. La marche à suivre, pour connaitre la proportion des oxydations liées au travail physiologique, consiste donc à évaluer ce travail et son rendement, afin de voir ce qu'il représente dans le métabolisme total, en considérant le cas le plus simple, celui d'un organisme sans croissance, à l'état stationnaire.

---

[3] Une remarque intéressante au point de vue du mécanisme de l'effet Pasteur est que le potentiel correspondant à la reaction 4, dont la vitesse règle probablement la marche de la resynthèse, est très élevé, voisin de O,1 volt. Cette valeur suggère un mécanisme de catalyse autre qu'un rattachement direct à la chaine protéoflavine-cytochromes.

IV. UTILISATION DE L'ÉNERGIE DU MÉTABOLISME

S'il est aisé de connaitre le travail extérieur fourni par un organisme et la chaleur qu'il dégage, il est difficile d'étudier les transformations d'énergie intermédiaires qui précèdent la production d'une partie de cette chaleur. Par exemple l'ordre de grandeur des travaux osmotiques permanents nous échappe, faute de données suffisantes sur les vitesses de passage des substances à travers les surfaces de séparation. Il faudrait aussi tenir compte de synthèses qui portent sur des quantités de matière très petites, mais peuvent être onéreuses. Néanmoins une évaluation raisonnable peut être faite.

Ainsi, chez l'Homme, le travail du coeur correspond à environ 20 calories kg par 24 heures, et le travail de concentration du rein à 1,5 calories kg. Il faut ajouter le travail des muscles respiratoires, des muscles lisses. En admettant que le rendement de la transformation de l'énergie chimique en travail mécanique dans le muscle est de 20%, et que le rendement du travail rénal est aussi bas que 1%, il reste 80 à 85% du métabolisme représentant des oxydations liées à des synthèses assimilatrices, ou indépendantes ; dans les conditions où se mesure le métabolisme de base, les synthèses en question sont évidemment des "resynthèses" affectées à l'entretien de la composition chimique de l'organisme.

La proportion élevée de ce reste est en accord avec ce que l'on sait de la consommation d'oxygène par les tissus isolés de mammifères. Cette consommation est, au moins pour certains tissus, égale à celle que l'on a pu déterminer chez un organisme aussi différent que l'est le *Sterigmatocystis nigra*. Dans de tels cas, il faut faire la discrimination entre les fermentations liées à la croissance et celles qui correspondent au maintien des cellules dans leur état stationnaire. On y est parvenu en faisant varier, la vitesse de croissance (TERROINE & WURMSER (15))[4]. Ce que l'on désigne habituellement par Q_{o_2} c'est-à-dire le nombre de mmc^3. d'oxygène consommé par mg de poids sec de mycelium a été trouvé égal à 8,3, alors que l'on admet pour le foie, le rein, le pancréas des mammifères les valeurs respectives II, 21,3.

La necessité des resynthèses provient du fait que, malgré la protection des glucides, une quantité très notable de lipides et de protides sont oxydés irreversiblement. On conçoit du reste que le potentiel intracellulaire est une grandeur moyenne, et qu'il doit exister un gradient entre la periphérie aérée et le centre des cellules. Il faut donc s'attendre à ce qu'une part du métabolisme soit utilisée aux remaniements qui transforment un aliment en un constituant cellulaire. Ce sont essen-

[4] La mesure du metabolisme endogene, sur des cultures non proliferantes, quoiques moins physiologique, peut aussi fournir des données utiles.

tiellement des liaisons esters et peptides. Mais les quantités de protéines et de lipides brulés quotidiennement ne représentent respectivement que 0,5% et 1,5% des quantités existant dans le corps. Bien plus nombreuses sont les ruptures de liaisons correspondant à l'échange des acides gras entre eux et des aminoacides entre eux. On sait, surtout grace à la méthode des isotopes, que lipides et protides s'hydrolysent incessamment et se reconstituent.

D'après les données de Rittenberg & Schoenheimer (16), on peut estimer que la resynthèse doit porter chaque jour sur 7% des acides gras. La leucine du foie est désaminée et réaminée à raison de 10% par jour, résultat en parfait accord avec notre hypothèse de l'equilibre entre les aminoacides et les acides cétoniques. En l'absence de données plus précises sur ces échanges et sur les concentrations des substances, il serait illusoire de calculer le travail correspondant. La variation d'énergie libre de l'estérification est d'environ + 1000 calories gr par mol. La variation d'énergie libre de la liaison peptidique est de + 7520 calories gr dans la leucylglycine (Borsook (17)), et peut-être beaucoup moins dans la protéine in vivo. Tels quels ces chiffres laissent prévoir que la resynthèse des lipides à partir des acides gras exige un travail quotidien de l'ordre de 2 calories kg, et la resynthèse des protéines à partir des aminoacides, un travail de 90 calories kg.

Ce travail, peut être compensé par la diminution d'énergie libre correspondant à certains stades de l'oxydation des glucides. Par exemple la liaison des acides gras à la glycerine ou des aminoacides entre eux se fera, comme le suggère Lipmann, par l'intermédiaire des acylphosphates, et ceux-ci seront formés par l'adénylpyrophosphate provenant de l'oxydation des glucides. Le transfert d'énergie se ferait donc par les transporteurs de groupes phosphorylés. Dans une autre hypothèse, si l'on retient les vues de Delbruck (18), le transfert se ferait par transporteurs d'hydrogène venus au contact de la molécule de lipide ou de protide, cette dernière etant vraisemblablement étalée en surface.

Tout se passe, à certains égards, comme dans la protection des aminoacides, contre l'oxydation. Des glucides, dans ce dernier cas, sont oxydés à la place des aminoacides. Dans la protection contre l'hydrolyse, il en est de même, sauf que le processus de resynthèse ne se fait pas dans des conditions de réversibilité complète. Dans les deux cas, les transporteurs d'hydrogène, comme de groupes phosphorylés, ont leur concentration fixées par un état stationnaire.

L'economie de la resynthèse provient de ce qu'elle est faite aux depens des oxydations de glucides, qui s'accomplissent de toutes façons. En cela la resynthèse diffère de la croissance, où une plus grande quantité de métabolites sont mobilisés, où un dechet de matière

considérable peut être nécessaire pour obtenir certaines molécules particulières, où ce n'est plus seulement la répartition entre oxydations liées et indépendantes qui varie, mais bien le total des deux sortes d'oxydations qui est accru. Pour la même raison le rendement des synthèses qui se font dans des organes specialisés peut être assez mediocre. SCHAEFFER a atiré l'attention sur l'importance de ces localisations (19). Ainsi les oxydations dependent en première approximation des catalyseurs deshydrasiques. Une addition de métabolites n'augmentera pas la production de chaleur si les substances ajoutées entrent en compétion avec les métabolites déjà présents, pour occuper les enzymes disponibles. Mais si le métabolite ajouté entraine une transfortion se faisant dans un organe specialisé, il n'y a pas de substitution aux autres oxydations, et il apparait une certaine action dynamique spécifique.

Puisque l'urée se forme exclusivement dans le foie, sa synthèse, qui pour la degradation de 70 gr de proteine par jour correspond à une augmentation d'énergie libre de 5 calories kg, peut être associée à des oxydations supplementaires. L'importance des oxydations liées a la formation de l'urée, et par consequent le rendement de l'opération, n'est pas connue. Il est clair que ces oxydations liées devraient être defalquées des oxydations indépendantes, au point de vue qui nous occupe, étant donné le rôle physiologique de l'élimination de l'urée. Par contre toutes les synthèses de corps intermediaires, les "recaptures" entrent dans les oxydations indépendantes. Parmi elles, se trouve comprise la transformation eventuelle d'acide lactique en glucide, suivant un cycle de Meyerhof, sauf dans la reconstitution du glycogène consommé par les contractions musculaires permanentes, puisque on en a tenu compte dans le rendement du travail mécanique.

V. RÔLE DES OXYDATIONS INDEPENDANTES

En résumé sur un métabolisme de base de 1800 calories kg on trouve une utilisation physiologique par transfert d'énergie de 450 calories kg environ, soit 25%. Le reste est dissipé en chaleur sans phases d'utilisation intermédiaire. Dejà, puisque le potentiel du système cytochrome c $\rightleftharpoons$ oxycytochrome c'est $+$ 0,255 volts à pH 7 (WURMSER & FILITTI-WURMSER), une quantité d'énergie libre de 26000 calories gr par molécule d'hydrogène, est inéluctablement transformée directement en chaleur (20). En effet, dans cette phase ultime de la respiration cellulaire, la combinaison de l'hydrogène se fait avec l'oxygène libre, sans couplage, et par conséquent sans utilisation énergetique. Le reste de la dissipation thermique résulte du manque de coincidence entre les potentiels d'équilibre des transporteurs et des systèmes de métabolites sur lesquels ils agissent.

Ce gaspillage apparent assure pourtant une véritable fonction physiologique, qui est le maintien du potentiel intra-cellulaire à son niveau normal. Ce potentiel ne détermine pas seulement de manière directe le sens de nombreuses oxydoréductions de métabolites, des aminoacides par exemple, il détermine aussi, indirectement, l'orientation de reactions très diverses parce que des groupes prosthétiques d'enzymes sont eux-mêmes sujets à l'oxydoreduction. Or ces potentiels, nous l'avons vu, sont fixés par le régime des vitesses d'hydrogénation et de deshydrogénation des transporteurs. De même que le flux d'hydrogène provenant des glucides protège de l'oxydation les acides gras et aminés, de même le flux d'oxygène chez les aérobies, ou le degagement d'hydrogène chez certains anaérobies protège les cellules contre des reactions anormales qui resulteraient de l'abaissement progressif du potentiel intracellulaire.

La plus grande part des fermentations — en comprenant sous ce terme toute les réactions qui donnent naissance à des substances apparaissant hors des cellules — n'ont pas d'autre rôle physiologique, puisque les résidus d'oxydations liées à du travail physiologique sont peu de chose relativement aux résidus d'oxydations indépendantes. Ces fermentations constituent une élimination de l'hydrogène — aussi bien chez les êtres aérobies que chez les anaérobies. Les premiers, dans le stade ultime de la respiration cellulaire — qu'il serait plus coherent d'appeler fermentation hydrique — combinent l'hydrogène avec l'oxygène. Les anaérobies, qui n'ont pas de cytochromes, eliminent l'hydrogène tantôt à l'état moléculaire, tantôt fixe sur divers accepteurs autres que l'oxygène. Mais tous ces processus ont pour effet de maintenir les niveaux d'oxydoréduction intracellulaires à des hauteurs determinées.

RESUMÉ

Tout travail physiologique est, en définitive, compensé par des oxydations liées à des synthèses. Les cellules sont en outre le siège d'oxydations indépendantes, qui constituent d'ailleurs la plus grande part du métabolisme total, dans l'organisme au repos et sans croissance. Ces oxydations indépendantes des synthèses ont cependant une fonction physiologique : le maintien du potentiel intracellulaire à son niveau normal.

BIBLIOGRAFIA

1. WURMSER, R., 1923. L'énergétique et la biochimie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 5 : 487-503.
2. WURMSER, R., 1932, La signification biologique des potentiels d'oxydoréduction. *Biol. Rev.*, 7 : 350-365.
3. FILITTI-WURMSER, S. & MOREL, M., 1941, Sur l'équilibre entre quelques aminoacides et les acides cétoniques correspondants. *Enzymologia*, 9 : 369-372.
4. WURMSER, R. & FILITTI-WURMSER, S., 1939, Sur l'équilibre entre la valine et le diméthylpyruvate d'ammonium. *Enzymologia*, 7 : 161-164.
5. WURMSER, R., 1935, *L'électroactivité dans la chimie des cellules*. Hermann et Cie., Paris (*cf.* p. 17).

6. WURMSER, R. & FILITTI-WURMSER, S., 1937, Le rôle de la protéoflavine dans l'équilibre électrochimique des cellules. *Enzymologia*, 4 : 137-138.

7. KREBS, H. A., 1935, Deamination of aminoacids. *Biochem. J.*, 29 : 1620-1644.

8. MUÑOZ, J. M. & LELOIR, L. F., 1943, Fatty acid oxidation by liver enzymes. *J. biol. Chem.*, 147 : 355-362.

9. LELOIR, L. F., 1943, Communication au Séminaire de Biologie de l'Université du Brésil, Rio de Janeiro.

10. GREEN, D. E., NEEDHAM, D. M. & DEWAN, J. G., 1937, Dismutations and oxidoreductions. *Biochem. J.*, 31 : 2227-2352.

11. WURMSER, R. & MAYR-REICH, N., 1933, L'équilibre entre les acides lactique et pyruvique. *J. Chim. Phys.*, 30 : 249-255.

12. LIPMANN, F., 1941, Metabolic generation and utilisation of phosphate bond energy. In "Advances in Enzymology", 1 : 100-162.

13. AUBEL, E. & LÉVY, R., 1929, Le potentiel d'oxydoréduction dans les chenilles de *Galleria mellonella*. *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 101 : 756-758.

14. WURMSER, R. & FILITTI-WURMSER, S., 1936, Sur l'équilibre entre l'alcool isopropylique et l'acétone. *J. Chim. Phys.*, 33 : 577-586.

15. TERROINE, E. F. & WURMSER, R., 1922, L'énergie de croissance. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 4 : 519-538.

16. RITTENBERG, D., 1941, The state of the proteins in animals as revealed by the use of isotopes. *Cold Spring Harbor Symp.*, 9 : 283-288.

17. BORSOOK, H. & HUFFMAN, H. M., 1938, *In Schmidt's Chemistry of the Aminoacids and Proteins* (*cf.* p. 865).

18. DELBRÜCK, M., 1941, Autocatalytic Synthesis of polypeptides. *Cold Spring Harbor Symp.*, 9 : 122-126.

19. SCHAEFFER, G. & LE BRETON, E., 1939, *L'action dynamique spécifique des protides*. Hermann et Cie., Paris.

20. WURMSER, R. & FILITTI-WURMSER, S., 1938, Le potentiel d'oxydoréduction du système cytochrome c $\rightleftharpoons$ oxycytochrome c. *J. Chim. Phys.*, 35 : 81-86.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):81-86
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

SÔBRE O DESENVOLVIMENTO INTRACELULAR DO "SCHYZOTRYPANUM CRUZI" EM CULTURA DE TECIDO COMO MEIO DE VERIFICAÇÃO DA AUTONOMIA CELULAR [1]

H. MEYER e M. X. OLIVEIRA
Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 11 figuras no texto)

Sabe-se desde os primeiros tempos da cultura de tecido que as células "in vitro" estão sempre em contacto mais ou menos íntimo, os fibrócitos por meio de finos prolongamentos protoplasmáticos e as células epiteliais, de forma poligonal, aderindo intimamente uma à outra, crescendo em forma de mosaico, sendo muitas vezes impossivel ver os limites entre duas células.

A cultura de tecido parece, por isso, oferecer um material muito favoravel para o estudo da questão da autonomia celular, isto é, se as células dos tecidos representam unidades autônomas, anatômica e fisiologicamente. Muitos pesquisadores tentaram resolver esta questão com auxílio da cultura de tecido. Seria impossivel detalhar aquí todas as experiências que foram feitas e todos os resultados obtidos e que procuravam provar ou negar a autonomia celular. Foram examinados os pontos de contacto entre duas células e autores como FISCHER, DE HAAN, HUZELLA, ERDMANN, LASER e LUNA (1,2) são a favor de uma continuidade material entre duas células porque pensam ter visto passar partículas celulares (grânulos, bastões de pigmento, etc.) de uma célula para outra ; FISCHER acha até que este contacto é indispensavel para a continuação da vida das células "in vitro" e que células isoladas são incapazes de entrar em divisão e formar uma cultura. Outros autores como G. LEVI, LEWIS & LEWIS, CHAMBERS e colaboradores, KREDEL, OLIVO, DE GARIS, (1,2) são de opinião contrária, considerando estes contactos transitórios e a observação de passagem de material de uma célula para

[1] Recebido para publicação a 9 de Março de 1944.
Trabalho realizado no Laboratório de Biofísica (Diretor : Prof. Carlos Chagas Filho) da Faculdade Nacional de Medicina.

outra precária porque muitas vezes as células e os seus prolongamentos se sobrepõem e não é possivel distinguir os limites de uma célula. Lewis & Hughe, por exemplo, trataram culturas de tecido com glicerina ou com soluções hipertônicas e observaram que as células, sob influência destas soluções, recolhem todos os seus prolongamentos para emití-los depois novamente, sendo então o contacto entre elas simples adesão.

Peterfi & Woedermann para estudar a questão fizeram micropunturas em células aderentes e viram que o efeito das mutilações se transmite para as células vizinhas, porém Chambers & Fell (6), executando também micropunturas e estudando sistematicamente vários tipos de células em culturas, observaram que as células mutiladas recolhem os seus prolongamentos, o núcleo coagula e a célula morre e que nunca o efeito das mutilações se transmite para outras células. Somente quando a célula é destruida em mitose na telofase, estando ainda ligada à outra por meio de uma ponte protoplasmática é que a célula irmã morre também.

Outro meio de experimento é o da transmissão do impulso funcional. A. Fischer, juntando dois fragmentos de corações que de início pulsavam com ritmo e frequência diferentes, verificou começarem eles a pulsar sincronicamente logo que as duas zonas de crescimento se tocam, considerando assim que o contacto material entre as células dos dois explantados diferentes é responsavel pela transmissão do impulso fisiológico que obriga agora os dois fragmentos a pulsar simultaneamente. Viu mais que este contacto das zonas de crescimento não se faz em corações de animais diferentes, os quais continuam sempre a pulsar com ritmo próprio. Olivo, ao contrário, obteve pulsações simultâneas também em corações de animais diferentes. As recentes descobertas a respeito da transmissão do impulso nervoso contudo não tornam a hipótese de Fischer obrigatória.

O *Schizotrypanum Cruzi* introduzido em cultura de tecido penetra nas células e cumpre aí o seu ciclo evolutivo, como foi mostrado em trabalhos publicados anteriormente (Kofoid e colaboradores (9) e Romana & Meyer (7)), penetra, assumindo a forma de Leishmania e se multiplica sob esta forma, para voltar depois a forma flagelada e por fim sair das células que são sempre destruidas por êle.

Observações mais recentes em centenas de culturas de tecido [2] e células parasitadas mostram que este ciclo do Tripanosoma está sempre ligado a uma só unidade celular. O parasito na forma de Leishmania se multiplica no protoplasma de uma célula até que esta fica cheia. Células parasitadas pela forma de Leismania podem ainda entrar em divisão mitótica. Durante o processo mitótico os parasitos são distribuidos nas duas células filhas por partes iguais ou desiguais, como já

[2] Técnica e material usados, como os descritos em trabalho anterior de Romana & Meyer (7).

foi mostrado (Meyer & Oliveira (8)). Quando a célula está repleta o seu protoplasma totalmente ocupado pela forma de Leishmania, começa a mostrar sinais de degeneração (granulações, vacuolos, etc.). É neste momento que começa a transformação do parasito na forma flagelada (figs. 1 e 2). Evidentemente as condições fisiológicas destas células esgotadas, em via de regressão, não apresentam mais o meio propício para a vida da forma intracelular do parasito e a forma de Leishmania se transforma na forma flagelada. A quantidade final de Tripanosomas formados num ciclo varia segundo o tamanho da célula parasitada. Quando a célula é pequena a quantidade é menor do que nas células grandes (célula nervosa do gânglio espinhal), quando então a quantidade de parasitos formados é muito grande (figs. 3-5, todas com o mesmo aumento). Isto mostra que o número de Tripanosomas que se formam em um ciclo *não depende do Tripanosoma inicial, mas das condições fisiológicas que a célula hospedeira lhe oferece.*

Tanto em culturas de fibrócitos como em membranas de epitélio ou em fibras musculares vêm-se células parasitadas pela forma adulta circundadas por células normais, completamente intactas (figs. 6-8). Se existisse continuidade material entre as células, a forma de Leishmania poderia passar para as células vizinhas (o que se observa só durante o processo mitótico), ou então, por meio dos pontos de contacto, material nutritivo de uma célula não parasitada passaria para a célula parasitada e forneceria os meios necessários ao desenvolvimento parasitário e assim se deviam formar grandes áreas com Leishmania, formadas por células confluidas ou à custa de células vizinhas que nunca ou só muito tarde chegariam à maturação. Isto não foi observado até agora nas culturas de tecido. Frequentemente se observam células com dois núcleos, parasitadas. Células binucleadas são frequentes também em culturas não parasitadas, especialmente em culturas velhas que não foram repicadas regularmente e que se formam por divisão do núcleo que não é seguida da divisão do protoplasma. Tais células apresentam uma unidade celular ; Chambers & Fell (6), por exemplo, destruiram um dos núcleos de células binucleadas com micropuntura e a célula sobreviveu com um núcleo só.

Muito frequentemente se observam células aderentes, mostrando parasitos em estados diferentes da sua evolução (fig. 9). O ciclo evolutivo do Tripanosoma fica sempre limitado a uma unidade celular, a célula vizinha não tendo a menor influência fisiológica no ciclo do Tripanosoma da célula parasitada. Quando a célula parasitada morre, recolhe os prolongamentos (fig. 10), às vezes toda a célula se retrai bruscamente e assume forma redonda (fig. 11), os Triponosomas saem, de repente ou devagar, segundo a consistência da superfície celular que pode ser mais ou menos resistente. Nunca a morte de uma célula afeta as células vizinhas que continuam intactas.

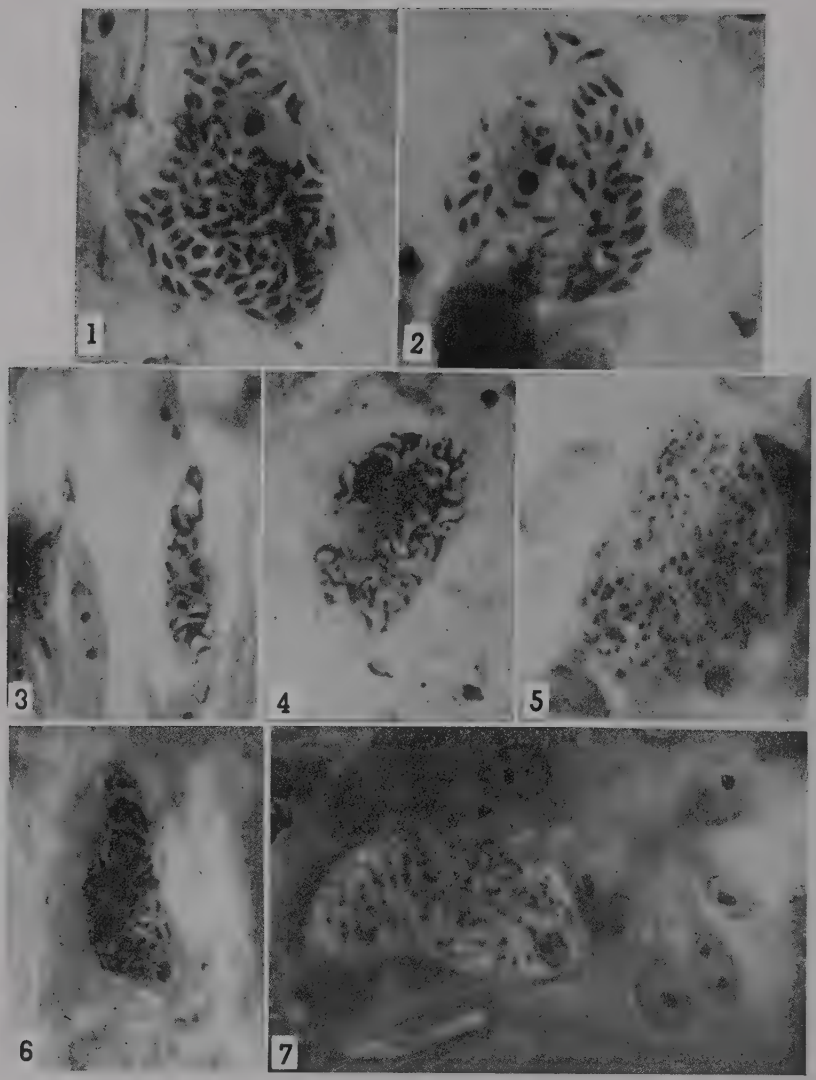


Fig. 1 — Fibrocito de miocárdio de embrião de galinha, célula repleta, o parasito em via de transformação para a forma flagelada (Fix. Regaud, Hem.férrica) (Heart fibrocyte from chicken embryo; the whole protoplasm is occupied by parasites in transformation to the adult form). Fig. 2 — Epitélio de amnio de embrião de galinha, célula repleta, o parasito em via de transformação para a forma flagelada (Fix. Zenker, Hem.férrica) (Amnion epithelium from chicken embryo; the whole protoplasm occupied by parasites in transformation to adult form). Fig. 3 — Pequeno histiocito de baço de embrião de galinha; parasitos em forma adulta, cerca de 14 tripanosomas (Fix. Regaud, Hem.férrica) (Small histiocyte of spleen from chicken embryo; parasites in adult form, about 14 trypanosomes). Fig. 4 — Fibrocito de miocárdio de embrião de galinha; parasitos em forma adulta, saindo da célula, cerca de 66 tripanosomas (Fix. Regaud, Hem.férrica) (Heart fibrocyte from chicken embryo; parasites in adult form leaving the cell, about 66 trypanosomes). Fig. 5 — Célula nervosa de gânglio espinhal de embrião de galinha. Parasitos em forma adulta; sendo a célula nervosa de forma esférica, é impossivel ver todo o parasito e contar com segurança o número de parasitos nela formados (Fix. Regaud, Hem. férrica) (Nerve cell of spinal ganglion from chicken embryo; parasites in adult form. Due to the spherical form of the nerve cell it is impossible to see the whole parasite and count exactly the number of parasites in it). Fig. 6 — Epitélio de iris de embrião de galinha, uma célula com os parasitos em forma adulta (Fix. Regaud, Hem.férrica) (Iris epithelium from chicken embryo, one cell with parasites in adult form). Fig. 7 — Epitélio de amnio de embrião de galinha, uma célula com os parasitos em forma adulta (Fix. Zenker, Hem.férrica) (Amnion epithelium from chicken embryo, one cell with parasites in adult form).

A ação do *S. Cruzi* sôbre as células em culturas, acima descrita, pode apresentar um novo método de investigação para o estudo das relações de interdependência entre as células. As células em culturas parasi-

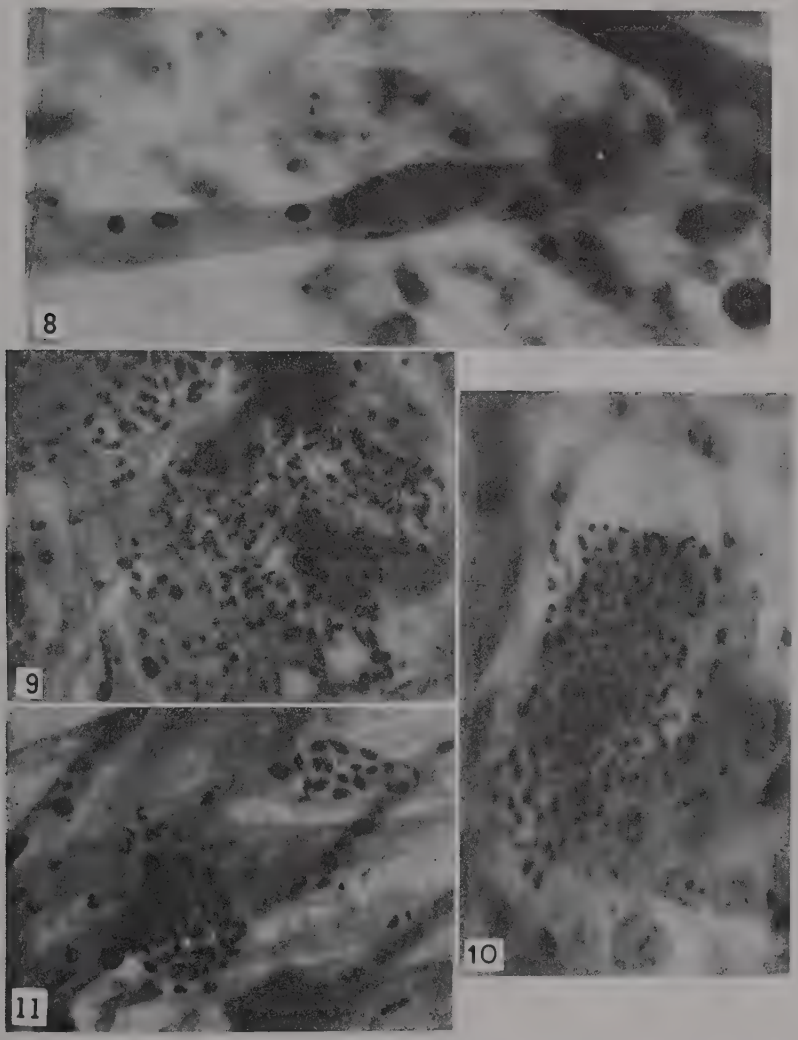


Fig. 8 — Fibra muscular de músculo esquelético de embrião de galinha, só uma célula da fibra está parasitada pela forma adulta (Fix. Zenker, Hem.férrica) (Muscle fibre of skeletal muscle from chicken embryo, only one cell of the fibre has parasites in adult form). Fig 9 — Epitélio de fígado de embrião de galinha; células aderentes mostrando os parasitos em estados diferentes de sua evolução (Fix. Regaud, Hem.férrica) (Liver epithelium from chicken embryo; adjacent cells showing parasites in different stages of development). Fig. 10 — Epitélio de iris de embrião de galinha, célula repleta em retração; as células aderentes estão intactas (Fix. Zenker, Hem.férrica) (Iris epithelium from chicken embryo, the whole protoplasm of the cell occupied by parasites; cell in retraction, adjacent cells in good conditions). Fig. 11 — Fibrocito de baço de embrião de galinha, retraido bruscamente, apresentando forma redonda; parasitos em forma adulta saindo da célula (Fix. Regaud, Hem.férrica) (Spleen fibrocyte from chicken embryo in retraction; parasites in adult form leaving the cell).

tadas por *S. Cruzi* se apresentam como unidades anatômica e fisiologicamente autônomas. A morte de uma célula parasitada não afeta as células vizinhas, as condições fisiológicas do protoplasma celular não se transmitem às células vizinhas como mostram o ciclo do *S. Cruzi* que fica sempre limitado a uma só unidade celular e a quantidade de Tripanosomas formados durante um ciclo que só depende do tamanho da célula hospedeira.

Em memória subsequente serão analisados os aspectos da questão particulares a cada tipo de cultura de tecidos.

SUMMARY

There is a strict relationship between the cycle of the *Schyzotrypanum Cruzi* and the host cell. The development of *S. Cruzi* in the cells goes on until the cell has its nutrient media exhausted, and the number of tripanosomes formed depends solely on the physiological conditions of the host cell. This fact may prove that cells in tissue cultures are independent units. Would there be an intercellular bond the parasite could migrate to an adjacent cell or from this cell would receive nutrient material. This has not been found in a great number of experiments. On the other hand, as shown in fig. 9 it is easily found that adjacent cells have tripanosomes in different stages of development. The life cycle of the parasite is always restrained to a single cell. In other papers the subject will be analized again with more detail.

BIBLIOGRAFIA

1. FISCHER, A., 1930, *Gewebezuechtung*. Muller u. Steinicke. *Munchen*.
2. LEVI, G., 1934, Explantation, besondern die Struktur und die biologischen Eingeschaften der in vitro geruechteten Zellen und Gewebe. *Ergeb. anat. Entwicklungsgesch.*, 31 : 125-707.
3. LEWIS, W. H., 1922, Is mesenchyme a syncytium ? *Anat. Rec.*, 23 : 177-184.
4. LEWIS, W. H., 1922, The adhesive quality of cells. *Anat. Rec.*, 23 : 387-392.
5. HOUGHE, M. J., 1919, The effect of hypotonic and hypertonic solutions on fibroblasts of the embryonic chick heart in vitro. *J. exp. Med.*, 30 : 617-648.
6. CHAMBERS, R. & FELL, H. B., 1931, Micro-operations on cells in tissue cultures. *Proc. R. Soc. Lond.*, B 109 : 380-403.
7. ROMAÑA, C. & MEYER, H., 1942, Estudo do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum Cruzi* em cultura de tecidos de embrião de galinha. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 37(1) : 19-27, ests. 1-6, figs. 1-12.
8. MEYER, H. & OLIVEIRA, M. X., 1942, Observações sôbre divisões mitóticas em células parasitadas. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, 14(4) : 289-292.
9. KOFOID, C. A., WOOD, F. C. & MCNEIL, E., 1935, The cycle of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture of embryonic heart muscle. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 41(3) : 23-24.

Rev. Brasil., Biol., 4(1):87-89
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

ASPECTOS DA UTILIZAÇÃO DO FÓSFORO POR ALGUNS ORGÃOS DE CAMONDONGOS TRATADOS COM P^{32}_{15} [1]

ANTONIO COUCEIRO
Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, D. F.

No decorrer de experiências destinadas a verificar autograficamente a distribuição de fósforo radioativo introduzido no organismo, foi determinada a taxa radioativa em alguns orgãos dos animais utilizados naquelas experiências. A exposição dessas determinações é finalidade da presente nota. Em subsequente memória exporemos a técnica empregada e os resultados colhidos com o emprego da autografia de cortes histológicos dos animais tratados com fósforo radioativo.

O simples conhecimento de que os elementos radioativos se comportam no organismo de maneira semelhante à dos seus isótopos estaveis, dispensa qualquer comentário sôbre a utilidade e importância do emprego de isótopos radioativos em biologia.

MATERIAL E TÉCNICA

Em um lote de 7 camondongos, com 48 horas, nascidos de mesma mãe, foram injetados 0.050 ml. de uma solução de fósforo radioativo, por animal. Esta dose foi fracionada em duas de 0.025 ml., administradas com intervalo de 72 horas. A injeção foi feita com agulha para uso intradérmico. O ponto de penetração da agulha foi a região interescapular e, com o fim de evitar qualquer refluxo do líquido injetado, se procurou levar a ponta da agulha tão longe quanto possivel, subcutaneamente, em direção caudal. A pequena porção de líquido não é suficiente para determinar escarificação da pele, mesmo de animais ainda mais jovens.

Foi utilizada uma solução de fósforo radioativo, gentilmente enviada ao Laboratório de Biofísica pelo Prof. Robley D. Evans, do Massachusetts Institute of Technology, com as seguintes características: 21 mg. de P sob a forma de H_3PO_4; volume — 8ml.; atividade — 6 millicuries. A solução foi preparada em 29-12-1943 e a sua vida média é de 14.7 dias. Da etiqueta consta o número de ordem — 738.15.

---

[1] Recebido para publicação a 9 de Março de 1944.
Trabalho realizado no Laboratório de Biofísica (Faculdade Nacional de Medicina), subvencionado por Guilherme Guinle.

Os animais em experiência foram sacrificados em datas diferentes e as determinações de fósforo radioativo foram executadas 1, 8, 17 e 30 dias após a segunda injeção de radiofósforo. Logo em seguida ao sacrifício, realizado por decapitação, retiram-se fragmentos de cérebro, fígado, rim, osso, músculo. Estes fragmento de orgão. Os fragmentos, postos em uma cápsula com a mistura de H_2SO_4 e 1 parte de HNO_3. Comumente empregam-se 2 ml. da mistura para cada fragmento de orgão. Os fragmentos, posto em uma cápsula com a mistura de ácidos, são levados à chama branda e aquecidos até o desprendimento de vapor, enquanto houver tecido por desintegrar. Quando na cápsula já não mais existe partículas sólidas, o líquido é transferido para um tubo graduado e o seu volume é completado com água distilada até 100 ml. Desta diluição retiram-se 2 ml. que são levados para o contador de Geiger-Muller a-fim-de ser determinado seu teor radioativo. Esta determinação se procede relacionando o número de impulsos registrados com o número registrado, em igual quantidade de tempo, quando o contador é posto em contacto com uma solução padrão, confeccionada diluindo um volume escolhido da solução injetada. Nesta solução padrão é conhecida a quantidade de fósforo radioativo e assim se torna facil estabelecer o número de impulsos que são deflagrados por uma fração tal de fósforo radioativo. Sabido o número de impulsos deflagrados por uma dose conhecida de fósforo, uma simples divisão indica a equivalência em fósforo de cada impulso isolado. Estabelecido o valor em fósforo radioativo de cada impulso, nada mais facil do que saber a riqueza em fósforo de qualquer solução de orgão de animais tratados com radiofósforo, desde que se conheça a quantidade de orgão posta no solvente. Comumente se refere a radioatividade indicando o número de impulsos por 100 g. de tecido, ou indicando, em miligramos, a quantidade de radiofósforo por 100 g. de tecido.

DADOS NUMÉRICOS E COMENTÁRIOS

Evidentemente, os fatos experimentais de que dispomos apenas nos permitem encarar o problema da distribuição do fósforo no organismo de uma maneira mais ou menos panorâmica. O número pequeno de dosagens e a flutuação dos resultados para alguns orgãos, flutuação possivelmente determinada por comportamento individual diverso dos animais injetados, dão a esta nota apenas feição divulgadora deste tipo de pesquisa atualmente em início no laboratório onde trabalhamos. Dosagens continuarão a ser feitas correlatamente com o estudo autográfico da distribuição do fósforo radioativo no organismo. Resultados mais amplos, calcados em maior número de observações, serão possivelmente divulgados em futuro próximo.

No quadro junto se vêem assinalados os resultados obtidos. Os animais são identificados por um número, indicador da série de experiência, e por uma letra, individualizando cada animal dentro de sua série. Juntamente com a identidade do animal está referida a data em que foi sacrificado. As três outras colunas indicam o fragmento de orgão examinado, o número de impulsos para 100 g. de tecido, e a quantidade de fósforo radioativo em 100 g. de tecido. Todos os animais foram injetados nos mesmos dias : 21 e 24 de janeiro de 1944.

Um rápido exame deste quadro é suficiente para notar a maior afinidade do tecido ósseo para o fósforo. Em qualquer das contagens o teor de radiofósforo por 100 g. de tecido ósseo é maior que o teor total de radiofósforo nos demais tecidos examinados. Esta relação, expressa em percentagem de radiofósforo ósseo, é de 66.89 ; 63.54 ; 54.25 ; 55.52 ; 62.97 ; 69.41 e 75.44, respectivamente para cada experiência, respeitada a mesma ordem seguida no quadro. Ao compararmos a percentagem de radiofósforo no cérebro, em relação ao radiofósforo de todos os tecidos, como fizemos acima em relação ao tecido ósseo, en-

contramos os seguintes números: 3.31; 10.11; 7.41; 15.28; 11.28; 6.48; 8.01. Em qualquer das dosagens subsequentes, o teor de radiofósforo é apenas uma vez inferior ao duplo do teor encontrado na primeira dosagem, 24 horas após a inoculação.

CAMONDONGO E DATA	FRAGMENTO DE ORGÃO	N.º DE IMPULSOS POR 100g DE TECIDO	mg DE RADIO-FOSFORO POR 100g DE TECIDO
	Osso	$10^7 \times 24.2$	17.95
9A	Músculo	$10^7 \times 3.1$	2.30
(25-1-1944)	Fígado	$10^7 \times 4.0$	2.97
	Cérebro	$10^7 \times 1.2$	0.89
	Rim	$10^7 \times 3.7$	2.74
	Osso	$10^7 \times 5.90$	5.84
9 B	Músculo	$10^7 \times 0.28$	0.28
2-2-1944)	Fígado	$10^7 \times 0.85$	0.84
	Cérebro	$10^7 \times 0.94$	0.93
	Rim	$10^7 \times 1.31$	1.30
	Osso	$10^7 \times 10.07$	9.95
9 C	Músculo	$10^7 \times 1.74$	1.72
(2-2-1944	Fígado	$10^7 \times 2.04$	2.02
	Cérebro	$10^7 \times 1.38$	1.36
	Rim	$10^7 \times 2.32$	2.29
	Osso	$10^7 \times 2.200$	4.230
9 D	Músculo	$10^7 \times 0.270$	0.519
(11-2-1944)	Fígado	$10^7 \times 0.398$	0.765
	Cérebro	$10^7 \times 0.592$	1.163
	Rim	$10^7 \times 0.488$	0.941
	Osso	$10^7 \times 2.590$	4.98
9 E	Músculo	$10^7 \times 0.258$	0.497
(11-2-1944)	Fígado	$10^7 \times 0.382$	0.735
	Cérebro	$10^7 \times 0.465$	0.894
	Rim	$10^7 \times 0.426$	0.819
	Osso	$10^7 \times 16.70$	15.7
9 F	Músculo	$10^7 \times 0.415$	0.496
(25-2-1944)	Fígado	$10^7 \times 0.950$	1.06
	Cérebro	$10^7 \times 1.68$	1.28
	Rim	$10^7 \times 1.018$	1.2
	Osso	$10^7 \times 4.56$	10.92
9 G	Músculo	$10^7 \times 0.753$	0.89
(25-2-1944)	Fígado	$10^7 \times 0.618$	0.73
	Cérebro	$10^7 \times 0.854$	1.16
	Rim	$10^7 \times 0.665$	0.78

A distribuição de fósforo nos demais orgãos examinados se mantém, com ligeiros desnivelamentos, praticamente comparavel nas sucessivas dosagens. Não há indício de ter havido saturação com a dose de radiofósforo injetada.

BIBLIOGRAFIA

CHAIKOFF, I. L., 1942, The application of labeling agents to the study of phospholipid metabolism. *Physiol. Rev.*, 22(4): 291-317.

HEVESY, G., 1940, Application of radioactive indicators in Biology. *Ann. Rev. Biochem*, 9: 641-662.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):91-94
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

SÔBRE A PRESENÇA DE "TANYPUS STELLATUS" COQUILLETT, 1902 NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL (Diptera, Chironomidae, Tanypodinae) [1]

S. J. DE OLIVEIRA

(Com 5 figuras no texto)

Na presente nota assinalamos a presença de *Tanypus stellatus* Coq., 1902, no Vale do Rio Doce, Estado de Minas Gerais, Brasil. *Tanypus stellatus* foi descrito originariamente dos Estados Unidos da América e como julgamos ser a primeira vez que sua ocorrência é assinalada na região neotrópica, aquí fazemos sua redescrição ; as referências aos *Chironomidae* (s. str.) são, em nosso país, diminutas ; por isto acreditamos ter alguma utilidade qualquer contribuição visando o melhor conhecimento desta família de dípteros nematóceros.

Tanypus stellatus Coquillett, 1902

Tanypus stellatus Coquillett, 1902 : 89.
Tanypus stellatus Kieffer, 1906 : 42.
Protenthes stellatus Malloch, 1915: 383.
Tanypus stellatus Johannsen, 1917 : 20

Descrição original :

"*Tanypus stellatus*, new species.

Yellowish brown, antennae except the basal joint pale yellow, abdomen blackish, a whitish ring at three-fourths the lenght of each femur, tibiae except each end, and tarsi except apices of the joints, light yellow, halteres yellow ; mesonotum thinly gray pruinose ; wings covered with many brown spots, several of which are confluent and inclose small whitish spots ; costal cell except at its apex brown ; first vein near its apex connected with the second by an oblique crossvein, fifth vein forks

[1] Recebido para publicação a 2 de Fevereiro de 1944.
Trabalho do Laboratório de Helmintologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

a short distance beyond the crossvein ; length, 2mm. A female specimen.

Habitat. — Texas.

Type. — Cat. No. 6164, U. S. N. M."

Descrição da pupa e do macho feita por MALLOCH (1915) :

"*Pupa.* — Thoracic respiratory organ broken. No discernible transverse tubercles on disc. Apical abdominal appendages shaped as in Fig. 5, (Plate XXIV), lateral margin of each with two long flat hairs.

Imago ; Male. — Similar to *punctipennis*, but differing as follows : general color much darker, the palest parts brown ; spaces between the vittae white pollinose ; apices of abdominal segments narrowly white pollinose ; legs marked as in *punctipennis* but the light and dark portions more sharply contrasting ; wings spotted in much the same manner as in *punctipennis*, but the spots are very dark, almost black, the most conspicuous being a large one covering the cross vein and extending well into the median cell. In other respects the species appear to be very much alike. Hypopygium as in Figure I, Plate XXVII."

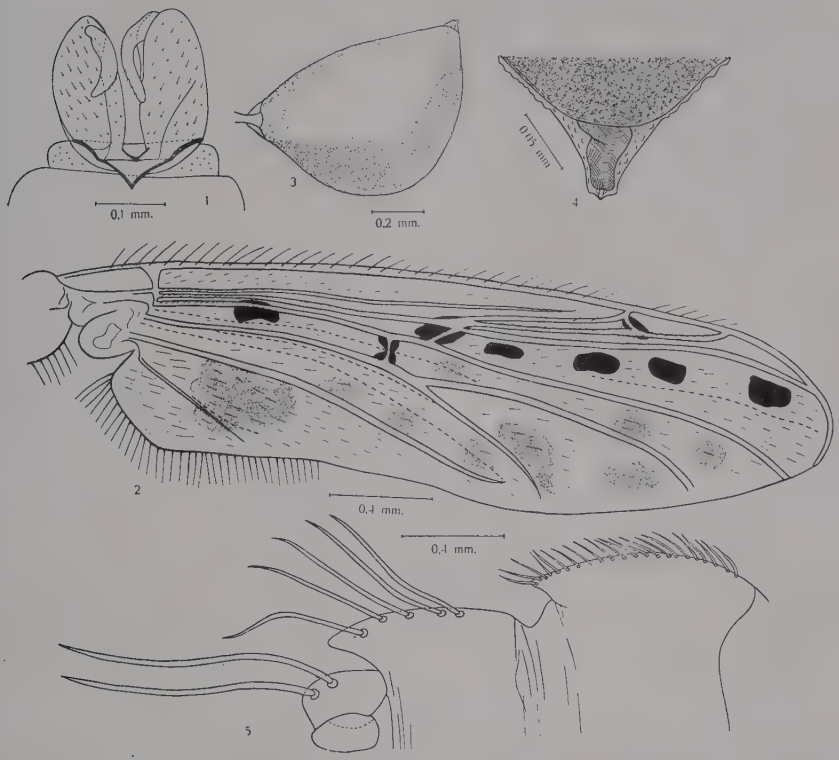
Redescrição :

Macho — Cabeça castanha-clara. Antenas com os segmentos amarelos, fortemente plumosos ; plumas amarelas ; toros castanhos-escuros, volumosos, cerca de 1/3 do tamanho dos olhos. Olhos pretos, com projeção dorsal, ladeando, portanto, os toros. Rebordo ocular com alguns pelinhos amarelos. Partes bucais amarelas.

Torax com o tegumento castanho. Pronoto castanho-claro, tendo lateralmente algumas cerdas amarelas; vistos dorsalmente os dois lóbos são quase fundidos e individualmente têm forma triangular. Mesonoto com uma longa faixa central cinzenta, dividida ao meio por uma linha castanha-escura, tendo, no centro, uma pequena área oval, com tegumento castanho e coberta com pequenos pêlos amarelos; logo após esta área existe, no tegumento, um desenho castanho, lembrando a figura geométrica duma elipse. Cerdas dorsocentrais pequenas e amarelas. Área antescutelar castanha-escura. Escutelo castanho-claro, sem cerdas. Postnoto negro, sem cerdas, com uma pequena depressão central. Pleuras com tegumento castanho- claro, exceto na esternopleura, onde é mais escuro.

Asas cobertas por pequeninos pêlos amarelos e com manchas pretas e cinzentas na membrana ; franja amarela ; álula sem franja ; esquâmula com franja amarela ; nervuras robustas, castanho-claras, exceto ao nivel das manchas ; *f-cu* próxima de *m-cu*. Distribuição das manchas : uma preta no terço basal de *M* ; uma preta, conspícua, sôbre *r-m*, atingindo a base de R_{2+3} e a base de R_{4+5} ; uma preta sôbre *m-cu*, quase ligada a de *r-m* ; uma preta sôbre R_2; célula R_5 com três pretas basais e uma cinzenta apical ; célula *M* com cerca de três cinzentas ; célula Cu_1 com duas cinzentas : uma no ápice de Cu_1, outra no ápice de Cu_2 ; célula *An* com cerca de quatro cinzentas ; lobo anal sem manchas. Halteres amarelo-pálidos.

Pernas : coxas castanha-escuras, com pequenas cerdas na parte interna. Trocânteres castanho-escuros. Fêmures amarelos com um pequeno anel sub-



Tanypus stellatus Coquillett, 1902 — Fig. 1: Terminália do macho: fig. 2: asa da fêmea ; fig. 3 : trompeta da pupa ; fig. 4 : ápice da trompeta da pupa e detalhe do tegumento ; fig. 5 : sétimo, oitavo e segmento anal da pupa (S. J. de Oliveira *del.*).

apical castanho-escuro, ápice amarelo-claro ; há grande número de cerdas amarelas, pequenas. Tíbias amarelas, com um anel apical castanho-escuro ; voltado para a parte interna há um (ou dois) pequeno espinho negro ; cerdas amarelas. Tarsos amarelos, com um anel apical castanho-escuro ; cerdas amarelas. Primeiro segmento do tarso do mesmo tamanho que a tíbia. Unhas com cerca de 1/4 do tamanho do quinto segmento tarsal.

Abdômen : parte dorsal com tegumento castanho-escuro, coberto por grande número de cerdas amarelas. Parte ventral com tegumento castanho-escuro, sem cerdas.

Terminália (fig. 1) com a peça lateral cônica, pilosa ; pinça cerca da metade do comprimento da peça lateral, pilosa, voltada para dentro ; bordo externo da pinça ligeiramente serrilhado no seu terço apical.

Tamanho : cerca de 3 mm.

Fêmea — Semelhante ao macho ; tegumento um pouco mais escuro ; antenas com 15 segmentos curtos e castanhos ; o segmento apical é um pouco maior que os demais. Membrana da asa e nervuras escuras ; lobo anal acin-

zentado; todas as manchas da célula R^5 pretas (fig. 2) Tamanho: cerca de 3 mm.

Pupa — Tegumento coberto por pequenos espinhos, mais numerosos junto à inserção da trompeta respiratória, onde formam manchas castanhas. Trompeta respiratória (figs. 3 e 4) elipsóide irregular, castanha-escura, coberta por pequenos espinhos e calosidades; ápice (fig. 4) com pequeno canal que se abre para o exterior por um diminuto orifício; o canal está envolvido por uma membrana mais clara. Segmentos abdominais com pequenos pêlos laterais, exceto no oitavo (fig. 5) onde há, apenas, cinco cerdas longas e achatadas. No lóbo anal há, lateralmente, duas cerdas longas e achatadas (fig. 5). Tamanho: cerca de 5 mm.

Material examinado: 2 fêmeas, criadas de pupas (26-8-42); 1 macho, criado de pupa (3-8-43); várias peles de pupas (26-8-42 e 3-8-43), colecionados nas margens do riacho do Bananal, no local denominado Bicho-Grosso, Município de Itambacurí (Estrada de Rodagem Rio-Bahia, Vale do Rio Dôce) Minas Gerais, Brasil. S. J. de Oliveira col., da coleção de Dipteros do Instituto Oswaldo Cruz (Lab. de Helmintologia).

Tanypus stellatus Coq. é próxima de *Tanypus punctipennis* Meig., espécie européia encontrada no Chile (EDWARDS, 1931) mas é facilmente separada pela pupa, como se pode depreender pela seguinte chave de JOHANNSEN (1937):

"1 — Eighth abdominal segment on each side with five long filaments but without a fringe of short finer filaments .... *T. stellatus* Coq.
— Eighth abdominal segment on each side with four long filaments, and, in addition, a fringe of short finer filaments ..... *T. punctipennis* Meig."

Os adultos de *T. stellatus* são mais escuros que os de *T. punctipennis* e enquanto esta espécie tem 5 manchas claras na célula R^5 da asa, *stellatus* tem 4 manchas pretas. A larva de *T. stellatus* foi descrita por JOHANNSEN (1937).

BIBLIOGRAFIA

COQUILLETT, D. W., 1902, New Diptera from North America. *Proc. U. S. Nac. Mus.*, 25: 83-126.

EDWARDS, F. W., 1931, Diptera of Patagonia and South Chile. Part II. Fascicle 5. — *Chironomidae*: 233-331. 56 figs.

KIEFFER, J. J., 1906, Genera Insectorum, Fam. *Chironomidae*, Fasc. 42: 1-72. 4 pls.

MALLOCH, J. R., 1915, The Chironomidae, or Midges, of Illinois, with particular Reference to the Species occuring in the Illinois River. *Bull. Illinois St. Lab. Nat. Hist.*, 10: 274-543. pls. 17-40.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):95-101
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

MIRÍDEOS NEOTROPICAIS: REVISÃO DO GÊNERO "EURYLOMATA" REUTER (HEMIPTERA) [1]

JOSÉ C. M. CARVALHO
Escola Sup. Agric., Viçosa, Minas Gerais

(Com 8 figuras no texto)

Seguindo um programa traçado para revisão dos mirídeos neotropicais, apresentamos neste trabalho o gênero *Eurylomata*, que foi estabelecido por REUTER para reunir duas belas espécies da fauna chilena. Este gênero pertence a sub-família *Capsinae*, tribu *Resthenini*. O material em estudo foi gentilmente cedido pelo Dr. EMILIO URETA do Museu Chileno de História Natural, Drs. ROBERTO GAJARDO, EDWYN C. REED e C. J. DRAKE, aos quais agradecemos.

Eurylomata Reuter, 1909

Ofv. F. Vet. Soc. Foehr., 51(24): 2.

Corpo oval, largo, opaco, sem pontuação, sub-glabro, com pêlos somente no abdômen; cabeça vertical, 3/7 até 1/4 mais estreita do que a base do pronoto, quando vista de cima cerca de 1/3 mais curta de que o pronoto, duas vezes mais larga que longa, com margem anterior largamente arqueada, vértice largo, reto posteriormente, sem sulco longitudinal; cabeça com olhos pouco mais larga que o colar; quando vista de frente de largura igual ao comprimento ou um pouco mais curta, lora pouco proeminente; vista lateralmente de largura igual à metade da altura, fronte ligeiramente convexa, inclinada, ápice vertical, clípeo ligeiramente saliente, separado da fronte por uma impressão obtusa, discreta, sua base estando situada na metade da altura da cabeça, ângulo facial reto, lora afilando-se para o ápice, alargando-se para trás, gena alta, da mesma altura ou pouco mais alta que os olhos, gula curta, oblíqua; olhos pequenos, pouco salientes, finamente granulosos, arredondados quando vistos de cima, muito pouco elevados quando vistos de lado, divergentes para frente, ligeiramente sinuados; rostro atingindo o ápice ou pouco além do ápice das coxas posteriores, o segmento I atingindo o ápice do xifus do prosterno; antenas delgadas, inseridas próximo à margem ínfero-interna dos olhos, pilosas ou com pubescência preta, curta, pêlos sub-adpressos, o segmento I mais curto ou subigual ao

[1] Recebido para publicação a 9 de Fevereiro de 1944.

comprimento da cabeça quando esta é vista de frente, II mais delgado que o I, linear ou ligeiramente engrossado para o ápice.

Pronoto relativamente curto, fortemente trapeziforme, cerca de 1/3 mais curto de que sua largura na base, o seu ápice cerca de 2/5 ou quase a metade (3/7) mais estreito que a base, colar grosso, pouco mais estreito que a cabeça com os olhos, calos transversais ou um pouco oblíquos, pequenos, da mesma grossura do colar, superando a terça parte apical do comprimento do pronoto, pouco extendido para os lados, distantes entre si, com uma ranhura impressa entre eles, margem lateral exterior aos calos pouco ou largamente extendida, saliente adiante da margem posterior do colar, grossamente marginada, margem arredondada ou aguda, posteriormente aos calos sinuada para dentro, ângulos basais arredondados, margem basal arredondada para os lados, truncada ou largamente sinuada no meio, disco convexo posteriormente, ligeiramente inclinado para o ápice ; escutelo pouco mais curto que o pronoto, entumecido ; mesoescuto descoberto.

Hemélitros arredondados uniformemente em toda sua extensão, vestígios da veia clava presentes, comissura claval pouco mais longa que o escutelo, cúneo horizontal, um pouco mais longo que sua largura basal, fratura situada abaixo do ângulo basal interno da membrana, esta com duas aréolas, a maior fortemente arredondada ou anguloso-arredondada no ângulo apical interno.

Inferiormente : xifus do prosterno marginado lateralmente, mesoesterno ligeiramente convexo para o ápice, carena da mesopleura obliquamente saliente, orifício do metastétio distinto, entre as coxas medianas e posteriores, com abertura saliente ; coxas anteriores atingindo ou quase atingindo o meio do mesoesterno, as posteriores distantes da epipleura dos hemélitros, fêmures lineares, tíbias levemente engrossadas para o ápice, com pubescência preta e curta, espinosas, espinhos pouco mais curtos que uma grossura das tíbias, tarsos tomentosos, o I segmento mais grosso que os demais, o II metade do comprimento do I ; segmento genital com uma débil carena longitudinal mediana inferiormente ; terebra da fêmea superando o meio do abdômen.

Logotipo : *Eurylomata picturata* (Blanchard, 1852) Reuter, 1909.

Distribuição geográfica : América do Sul, Chile.

Gênero distinto pelo fato de ter a cabeça pouco mais larga que o colar, olhos pouco salientes, gena muito alta, pronoto curto e fortemente transversal, disco pouco inclinado posteriormente, calos pequenos, pouco extendidos lateralmente, margens laterais anteriores aos calos largamente marginadas, margem costal do cório bastante arqueada, tíbias distintamente espinhosas, segmento genital do macho carenado inferiormente e terebra da fêmea muito longa.

Eurylomata picturata (Blanchard, 1852) Reuter, 1909

Lygaeus picturatus Blanchard, 1852, Hist. Fis. Chile, Gay, 7:143.
Pytocoris gayi Spinola, 1852, Hist. Fis. Chile, Gay, 7:184.
Capsus gayi Signoret, 1863, Ann. Soc. Ent. Fr. (4s) 3:571; Walker, 1873, Cat. Het. 6:107.
Resthenia gayi Atkinson, 1890, Cat. Caps. 58.
Capsus picturatus Reed, 1901, Rev. Chil. Hist. Nat. (sep. p. 78).
Eurylomata picturata Reuter, 1912, Ofv. F. Vet. Soc. Foehr., 54(7): 39 ; Carvalho & Drake, 1943, Rev. Brasil. Biol., 3(3):296.

Macho : comprimento 7,8 mm., largura 3,3 mm.

Cabeça : comprimento 0,6 mm., largura 1,5 mm., vértice 0,81 mm., preta, lora, gena e gula vermelho-alaranjados. Rostro com 2,4 mm., marron-escuro,

alcançando as coxas posteriores, o segmento I atingindo o ápice do xifus do prosterno. *Antenas* : segmento I, comprimento 1,0 mm., delgado ; II, 3,2 mm., linear ; III, 1,3 mm. ; IV, 0,7 mm: ; pretos, com pilosidade densa e muito curta.

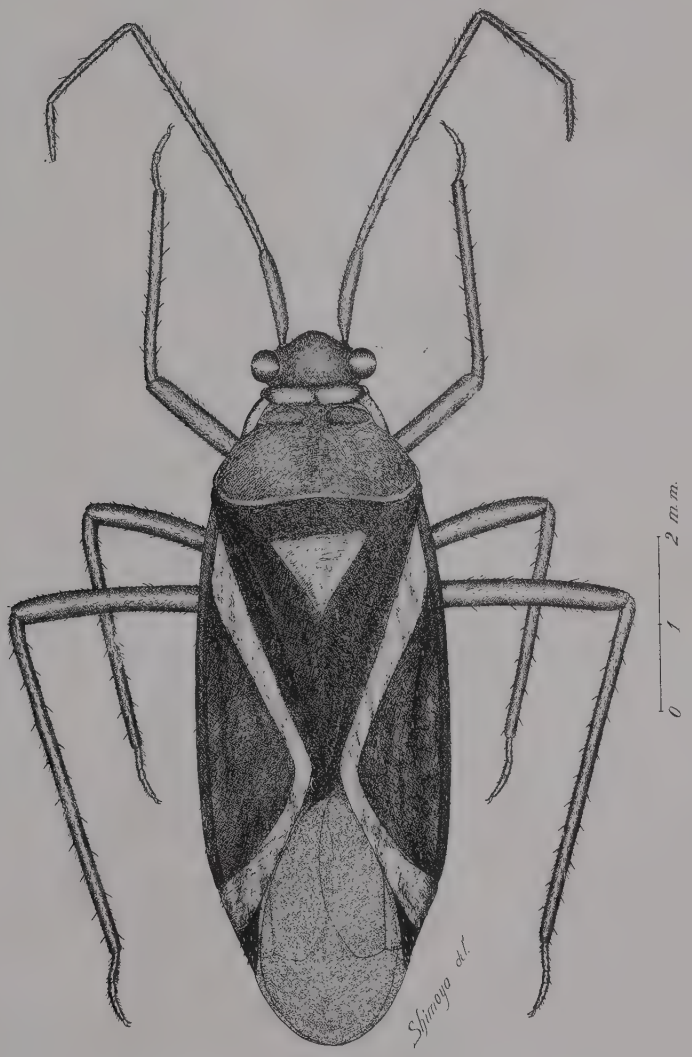


Fig. 1 — *Eurylomata picturata rubrosignata* Reut.

Pronoto : comprimento 1,3 mm., largura na base 2,4 mm., preto, margens laterais e posterior vermelho-alaranjadas, colar alaranjado, mesoescuto preto, escutelo alaranjado ; margens laterais anteriores aos calos salientes para fora e grossamente marginadas, colar muito fino dos lados.

Hemélitros : pretos, com uma faixa marginando o cório internamente até metade basal do cúneo de coloração vermelho-alaranjado ou sulfurescente-branca ; membrana marron-escura.

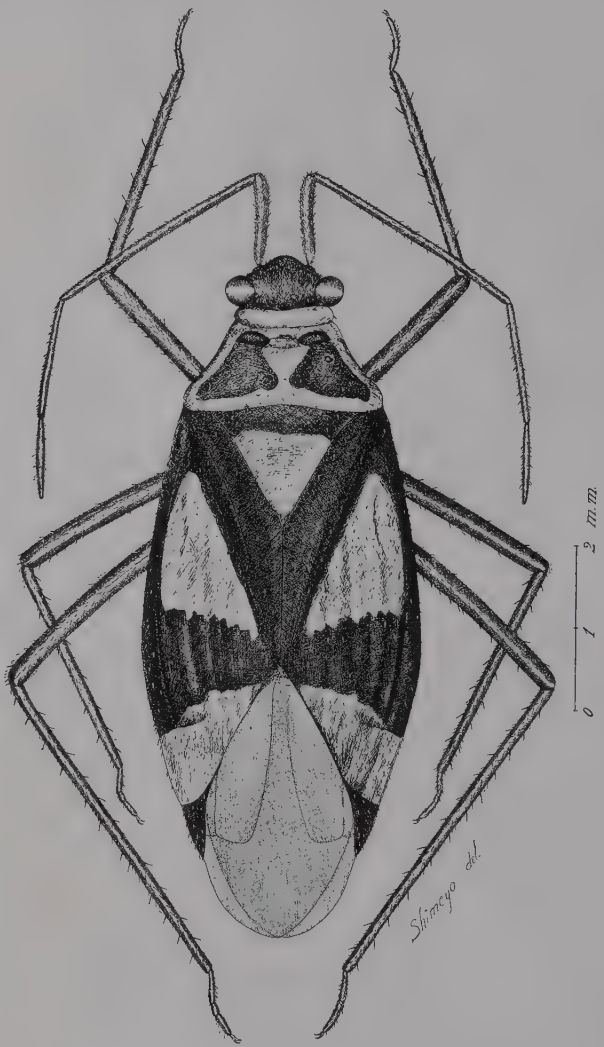


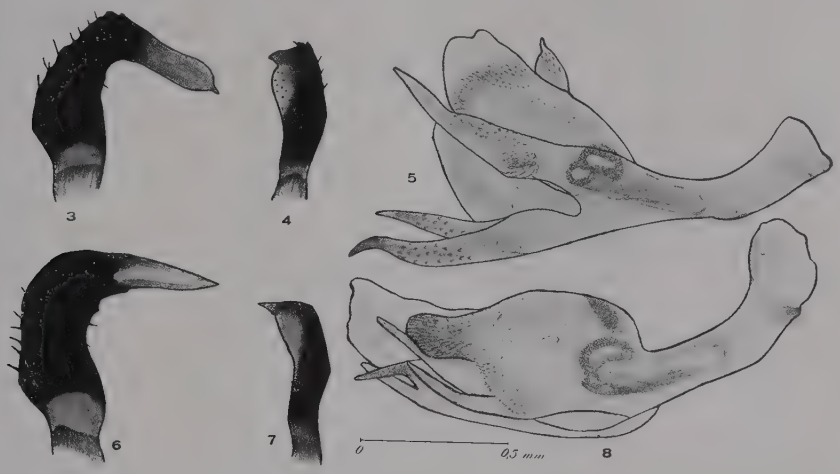
Fig. 2 — *Eurylomata speciosa speciosa* Sign.

Abdômen e lado inferior : marron-escuro, I e II segmentos avermelhados, epipleura do pronoto, meso e metapleura (exceto manchas), orifício do metastétio, vermelho-alaranjados, mesoesterno marron-escuro ; coxas vermelho-alaranjadas, fêmures, tíbias e tarsos pretos.

Genitália do macho : Igual em todas as variedades da espécie, descritas adiante. Órgãos perifálicos constando de um harpágono esquerdo, maior, afilado, curvo para dentro, com margem externa irregular contendo cerca de 10 a

12 cerdas (fig. 3). Harpágono direito terminando em ponta, quase reto, com área menos quitinosa próxima ao ápice e poucas cerdas na margem externa (fig. 4). Órgãos fálicos constando de apódema, falobase, ducto ejaculatório, gonóporo, aedeagus com dentes quitinosos em sua superfície e falômeros três maiores e um menor, também providos de dentes quitinosos (fig. 5).

Fêmea : semelhante ao macho em coloração e dimensões.



Eurylomata picturata picturata Blanchard — Fig. 3 : Harpágono esquerdo ; fig. 4 : harpágono direito ; fig. 5 : falus. *Eurylomata speciosa speciosa* Sign. — Fig. 6 : Harpágono esquerdo ; fig. 7 : harpágono direito ; fig. 8 : falus.

Esta espécie, variavel em coloração, apresenta as seguintes variedades :

Var. *picturata* Blanchard: preta, gena e gula, terço apical e margem lateral do pronoto, vermelho, margem basal do pronoto, margem interna do cório sulfurescente, epipleura do pronoto prolongando-se pelo cuneo até sua margem externa, delicadamente sulfurescente-branca posteriormente, escutelo preto com ápice ligeiramente vermelho. *Localidade* : 3 ♀ ♀ e 1 ♂, Valparaiso (Reed. *leg.*)

Var. *rubrosignata* Reuter (fig. 1) : semelhante à precedente, porém, com duas manchas medianas posteriores aos calos, margem basal do pronoto, escutelo (exceto na base), margem interno do cório prolongando-se pelo cúneo até sua margem externa, vermelhos, ápice do cúneo preto ; região do esterno, coxas, margem lateral do abdômen e base deste, vermelhos, mesoesterno e mancha na meso e metapleura, marron-escuros. *Localidades* : 1 ♂ Vina del Mar (Gajardo *leg.*), 1 ♀, Valparaiso (Reed *leg*).

Var. *Y* Reuter : semelhante a precedente, porém, com o pronoto preto lateralmente, margem basal pálida ou da mesma côr do pronoto. *Localidade* : 1 ♀, Condes (Mus. Nac. Hist. Nat., Chile).

Var. δ Reuter : semelhante a *picturata* porém com o hemélitro totalmente preto. *Localidade* : 2 ♀ ♀, Campo Grande (Carvalho *col.*)

Var. *torquata* Spinola: pronoto como na variedade *Y*, hemélitro como na variedade δ, meso e metapleura pretos, abdômen quase todo preto com ápice

largamente vermelho. *Localidade* : Santa Rosa (*apud* Spinola). Não representada na coleção do autor.

Var. *pluto* Spinola : preta, somente o colar avermelhado. Não representada na coleção do autor.

Eurylomata speciosa (Signoret, 1863) Reuter, 1909

Capsus speciosus Signoret, 1863, Ann. Soc. Ent. Fr. (4s) 3:571 ; Walker, 1873, Cat. Het., 6:105, 108 ; Atkinson, 1890, Cat. Caps.:112 ; Reed, 1901, Rev. Chil. Hist. Nat. (Sep. p. 79).
Eurylomata speciosa Reuter, 1909, Ofv. F. Vet. Soc. Fohr., 51:4 ; Carvalho & Drake, 1943, Rev. Brasil. Biol., 3(3):296.

Macho : comprimento 7,6 mm., largura 3,2 mm.

Cabeça : comprimento 0,6 mm., largura 1,4 mm., vértice 0,80 mm., preta, alaranjada ou descorada cerca da margem interna dos olhos, estes últimos pretos, lora, gena e búcula, alaranjados ; rostro com 3,0 mm. de comprimento, marron-escuro, atingindo além do ápice das coxas posteriores. *Antenas* : segmento I, comprimento 1,0 mm. ; II, 2,7 mm. ; III, 1,3 mm. ; IV, 0,8 mm., pretos, o II segmento muito ligeiramente afilado para a base ; densamente pilosos, pêlos pardo-amarelados.

Pronoto : comprimento 1,1 mm., largura na base 2,3 mm., vermelho-alaranjado, calos e uma larga mancha triangular posterior ligada a eles, pretos ; mesoescuto preto ; escutelo vermelho-alaranjado.

Hemélitros : clavo, embólio, ângulo basal, margem interna e larga faixa transversal posterior alargando-se para fora do cório, ápice do cúneo, pretos, o restante vermelho-alaranjado; membrana marron-escuro.

Abdômen e parte inferior: mesoesterno, II e III segmentos abdominais (exceto na linha mediana), III, IV e V totalmente (exceto na comissura), triângulo na região inferior do segmento genital, pretos, o restante alaranjado ; coxas alaranjadas, fêmures, tíbias e tarsos pretos.

Genitália do macho : Idêntica nas duas variedades da espécie ; órgãos perifálicos constando de um harpágono esquerdo cerca de 2 vezes maior que o direito, afilando-se para o ápice, curvo para dentro, com cerca de 6 cerdas na margem externa (fig. 6). Harpágono direito terminando em ponta curva para dentro, com uma região menos quitinizada próxima ao ápice (fig. 7). Órgãos fálicos constando de apódema, falobase, ducto ejaculador, gonóporo, aedeagus com dentes quitinosos curtos e longos em sua superfície e, 4 falômeros lisos (fig. 8).

Fêmea : Idêntica ao macho em côr e dimensões.

Esta espécie também possue duas variedades :

Var. *speciosa* Signoret (fig. 2) : facilmente caracterizada por ter o hemélitro preto e vermelho. *Localidades* : 1 ♂, Santiago (Mus. Nac. Hist. Nat., Chile) ; 3 ♀ ♀, Valparaiso (Reed *leg.*) ; 2 ♂ ♂ Los Andes (Carvalho *col.*) ; Rancagua (*apud* Reuter).

Var. *nigripennis* Reuter : preta, colar, parte dos calos, margem lateral até o meio da mancha posterior, aos calos, escutelo, gena e gula, prosterno, epipleura do pronoto, mancha da mesopleura próxima a coxa, metastétio e coxas, manchados de vermelho ; hemélitro todo preto. Não representada na coleção do autor.

CHAVE PARA DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES E VARIEDADES DE *EURYLOMATA*

1. Pronoto vermelho, com calos e duas manchas triangulares posteriores negras ; falus do macho com quatro falômeros lisos ... *E. speciosa* (Signoret)
   a. Hemélitro preto e vermelho-alaranjado ..... var. *speciosa* Sign.
   aa. Hemélitro todo preto ..... var. *nigripennis* Reut.
1'. Pronoto preto, com margens laterais e estreita margem basal vermelhas ou sulfurescente-brancas ; falus do macho com três falômeros grandes e um reduzido, todos com dentes quitinosos ..... *E. picturata* (Blanch.)
   a. Hemélitro todo preto ..... b
   aa. Hemélitro preto e vermelho ou preto-sulfurescente ..... d
   b. Preta, somente o colar avermelhado ..... var. *pluto* Spin.
   bb. Com outra coloração c
   c. Margens laterais do pronoto vermelhas ou sulfurescente-brancas ... var. *delta* Reut.
   cc. Margens laterais do pronoto pretas ..... var. *torquata* Spin.
   d. Margens laterais do pronoto pretas ..... var. *ipsilon* Rea.
   dd. Margens laterais do pronoto de outra côr ..... e
   e. Margem interna do cório e base do cúneo, vermelhos ..... var. *rubrosignata* Reut
   ee. Margem interna do cório e base do cúneo sulfurescente-brancas var. *picturata* Blanch.

SUMMARY

The author revises the genus *Eurylomata* Reut., Hemiptera, Miridae. Figures of *E. picturata picturata* Blanchard, *E. picturata rubrosignata* Reut. and *E. speciosa speciosa* Sign., are given.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):103-107
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

ÁCIDO LÁTICO E INIBIÇÃO PELO GÁS CARBÔNICO DAS CONVULSÕES POR ESTRICNISAÇÃO DA CORTEX CEREBRAL (EPILEPSIA DE AMANTEA) [1]

H. MOUSSATCHÉ e MARIA ISABEL MELLO
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

Já são numerosos os autores que assinalaram a ação inibidora do gás carbônico nas convulsões experimentais e humanas (1,2). Em uma nota publicada em 1927 (3), SWINGLE, WENNER & STANLEY estudaram seus efeitos sôbre a tetania de cães em que foram removidas as tiróides e paratiróides constatando exercer o gás carbônico idêntica ação inibidora.

SWINGLE e colaboradores procuraram verificar o mecanismo desta inibição. Observações anteriormente existentes sôbre a tetania, assinalavam a ação benéfica da administração de ácido clorídrico, cloreto de cálcio, cloreto de amônio pela acidose provocada. O gás carbônico provoca também uma acidose cuja natureza, para o caso dos animais sem tiróides e paratíróides, foi estudada.

Pela importância que tem o cálcio no mecanismo da tetania, este elemento foi dosado, o cálcio total mostrando-se invariavel antes e depois dos animais inspirarem gás carbônico.

Sob a ação do CO^2 o pH do sangue teve sensivel queda, mas o conteudo em gás carbônico do sangue também caiu, o que levou os autores a admitirem que a acidose não era provocada pelo CO^2 mas pelo aumento no sangue de algum ácido orgânico, provavelmente o ácido lático.

Em experiências subsequentes notaram realmente haver, após o tratamento dos animais em tetania paratireopriva pelo gás carbônico, um notavel aumento do ácido lático no sangue. Durante o período em

---

[1] Recebido para publicação a 18 de Fevereiro de 1944.
Trabalho da Divisão de Fisiologia e da Divisão de Química e Farmacologia do Instituto Oswaldo Cruz.

que os animais apresentaram a taxa de ácido lático do sangue elevada, não apareceram convulsões ; a queda do ácido lático ao nivel normal era acompanhada do aparecimento da tetania.

Estas experiências levaram SWINGLE e colaboradores a explicar a acidose provocada pelo gás carbônico a um aumento do ácido lático no sangue ; a acidose tornava o cálcio do sôro mais difusivel e, provavelmente, estimulava a excreção do excesso de fósforo, o que inibia a tetania paratireopriva.

Em um trabalho anterior (4) um de nós mostrou que o gás carbônico exerce uma ação inibidora sôbre as convulsões provocadas pela estricnisação da cortex cerebral motora de cães, e o mecanismo desta inibição vem sendo estudado. Neste trabalho procuramos verificar como se comporta o ácido lático no sangue dos animais em que as crises convulsivas foram inibidas e as relações entre a taxa de ácido lático no sangue e a frequência das crises convulsivas.

TÉCNICA

As experiências foram realizadas em cães. Os animais, antes de operados, eram narcotizados com morfina na dose de 1,5 a 2 centigramos por quilo de peso. Após trepanação e exposição da zona motora, determinava-se, por excitação elétrica, um ponto motor. A estricnisação do centro anteriormente determinado era feita com uma solução a 1% de sulfato de estricnina.

Os animais só iniciavam a inspiração da mistura de CO^2 quando as convulsões se sucediam com intervalos mais ou menos constantes. Permaneciam respirando a mistura 20-30 minutos. Empregamos misturas contendo sempre 18% de gás carbônico e aproximadamente 21% de oxigênio. Os animais, respiravam através uma cânula introduzida na traquéia e ligada à válvula inspiradora e expiradora de Tissot, misturas previamente realizadas em gasômetros.

As amostras de sangue para dosagem de ácido lático eram colhidas na artéria femural. As determinações foram feitas pela técnica de MILLER & MUNTZ adaptada para 0,1 cc. de sangue (5). Fizemos concomitantemente dosagens em sangue total com e sem anticoagulante. Como anticoagulante foi empregado o *liquoid* "Roche". A desproteinização foi sempre feita logo após a retirada do sangue.

RESULTADOS

Se a acidose produzida pelo gás carbônico é uma consequência do aumento do ácido lático no sangue, este também deve aumentar nos animais sem convulsões mas que respiram gás carbônico. Fizemos, assim, preliminarmente, algumas experiências dosando o ácido lático do sangue de animais que respiraram uma tensão de gás carbônico idêntica a que se mostrava inibidora das convulsões. No quadro abaixo damos os resultados das experiências em cinco cães :

QUADRO I

mg. de ácido lático em 100 cc. de sangue

Cão n.º	Antes de respirar CO^2	Logo após a respiração de CO^2	1 hora após respirar CO^2
I	13,5	10,0	17,0
II	18,0	11,0	14,0
III	14,0	9,0	13,8
IV	18,0	11,0	13,0
V	19,5	9,7	13,2

Todas as dosagens foram feitas em animais já submetidos à ação narcótica da morfina.

Os resultados acima expostos indicam que a inspiração de uma mistura contendo uma alta percentagem de gás carbônico diminue a concentração do ácido lático do sangue. Resultados idênticos foram encontrados, anteriormente, por ANREP & CANNAN (6), por LONG (7) e, mais recentemente, por LENNOX e colaboradores (8) em experiências em homens. Todos estes autores, porém, empregaram misturas contendo concentrações de CO^2 muito menos elevadas das que utilizamos para inibir as convulsões.

É claro, portanto, que a acidose induzida pela inspiração de CO^2 não está ligada a um aumento do ácido lático no sangue.

Em outro grupo de experiências determinamos como se comporta o ácido lático do sangue em animais com convulsões e depois da inibição destas pelo gás carbônico. Os valores foram os seguintes :

QUADRO II

Ácido lático em mg. por 100 cc. de sangue

Cão n.º	Antes de respirar CO^2	Durante o período convulsivo	Durante a inibição das convulsões pelo CO^2	Depois de suspenso o CO^2 e reinício das convulsões
I	30,0	74,0	59,8	—
II	24,3	63,8	28,0	53,8
III	13,8	75,6	47,5	53,0
IV	21,7	67,1	39,5	43,2
V	28,9	69,4	17,8	18,1

O seguinte protocolo esclarece a marcha das experiências que forneceram os resultados mencionados no quadro II :

Experiência de 17-1-44

Cadela n.º 3 — 6.200 g. — Presa na calha às 8.20 horas. Cânula na artéria femural. 8.55 : retirada de sangue para dosagem de ácido lático (15,7 mg. para

100 cc. de sangue); 9.00: injeção no peritôneo de 4 cc. de uma solução de morfina a 2% ; 9.30 : retirada nova amostra de sangue para dosagem de ácido lático (13,8 mg. por 100 cc. de sangue); 9.40: trepanação do lado direito, exposição da zona motora, determinação do centro do orbicular da pálpebra, cânula na traquéia; 10.02: iniciada a estricnisação com uma solução de sulfato de estricnina a 1% ; 10.08 : novo papel com estricnina, contrações clônicas do orbicular, excitação mecânica do orbicular ; 10.10 : ataque que durou 1'10"; 10.15: novo papel com estricnina; 10.20: novo papel com estricnina; 10.23: contrações clônicas fortes, excitação mecânica, ataque que durou 1'38"; 10.25: novo papel com estricnina; 10.32: novo papel com estricnina; 10.34: ataque espontâneo que durou 1'45"; 10.36: novo papel com estricnina; 10.40: ataque espontâneo que durou 1'38"; 10.45: ataque espontâneo que durou 2'10"; 10.48: tomada de amostra de sangue para dosagem de ácido lático (75,6 mg. por cento); 10.50: passou a respirar uma mistura contendo 18% de CO^2, novo papel com estricnina; 10.59: novo papel com estricnina, continua respirando CO^2; 11.06: novo papel com estricnina, continua respirando CO^2 ; 11.10 : amostra de sangue para dosagem de ácido lático (47,5 mg. por cento); 11.12 : passou a respirar ar atmosférico ; 11.15 : novo papel com estricnina, em seguida ataque espontâneo que durou 55"; 11.18: ataque espontâneo que durou 1'12"; 11.23: ataque espontâneo que durou 1'10"; 11.25 : amostra de sangue para dosagem de ácido lático (53,0 mg. por cento).

O protocolo transcrito corresponde a experiência no cão n.º III do quadro II. Ao se iniciarem os ataques convulsivos, a taxa do ácido lático era baixa. A elevação da concentração do ácido lático, certamente em consequência das contrações musculares, não diminuiu a frequência dos ataques convulsivos ; a abolição dos ataques, em consequência da inspiração da mistura contendo gás carbônico, coincide com uma baixa da concentração do ácido lático do sangue.

Não é, portanto, um aumento do ácido lático do sangue ou uma acidose provocada pelo aumento deste ácido, que e responsavel pela inibição causada pelo gás carbônico sôbre as convulsões por estricnisação da cortex cerebral.

Se a retirada das paratiróides e tiróides causa uma inversão no modo de ação do gás carbônico sôbre o ácido lático do sangue, é ponto a verificar. Em suas experiências, SWINGLE e colaboradores não submeteram os animais operados, antes da aparição da tetania, a ação do CO^2, como controle do modo de ação deste gás sôbre o ácido lático do sangue de animais sem paratiróides, ponto que poderia esclarecer os resultados opostos encontrados por estes autores.

CONCLUSÕES

1. A inspiração de uma mistura contendo alta percentagem de CO^2 faz diminuir a concentração do ácido lático do sangue ao mesmo tempo que inibe os fenômenos convulsivos experimentalmente provocados.

2. A inibição das convulsões pelo CO^2 não pode, assim, ser atribuida a uma acidose provocada por um aumento do ácido lático como o tinham suposto SWINGLE e colaboradores.

3. O reinício das convulsões pela suspensão da inspiração de CO^2 faz-se quando a taxa de ácido lático do sangue se encontra ainda abaixo de valores anteriormente atingidos.

CONCLUSIONS

1. La respiration de mélanges contenant un porcentage élevé de CO^2 produit une réduction de la concentration de l'acide lactique du sang, au même temps qu'elle inhibe des convulsions experimentalement provoquées.

2. L'inhibition des convulsions par le CO^2 ne peut pas être attribuée à une augmentation d'acidose provoquée par l'ácide lactique comme l'ont supposé SWINGLE et collaborateurs.

3. Quand on supprime la respiration de CO^2 les convulsions reviennent à un moment oú le taux d'acide lactique du sang se trouve encore au-dessous des niveaux antérieurment atteints.

BIBLIOGRAFIA

1. BROWN-SEQUARD, 1872, Note sur un moyen de produire l'arrêt d'attaques d'épilepsie et des convulsions causés par la strychnine et les pertes de sang. *Arch. Physiol. Norm. Path.*, 4 : 204-206.

2. LENNOX, W. G. & COBB, S., 1928, Epilepsy : from the standpoint of physiology and treatment. *Medicine*, 7 : 105-290.

3. SWINGLE, W. W., WENNER, W. F. & STANLEY, P., 1927, The effect of CO^2 administration upon parathyroid tetany. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 25 : 165-167.

4. MOUSSATCHÉ, H., 1943, Ação das altas tensões de gás carbônico sôbre as convulsões experimentais. *An. Ass. Quím. Bras.*, 2: 80-83.

5. MELLO, M. I. 1943, Lactacidemia. Métodos de dosagem do ácido lático. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 38 : 105-127.

6. ANREP, G. V. & CANNAN, R. K., 1923. The concentration of lactic acid in the blood in experimental alkalaemia and acidaemia. *J. Physiol.*, 58 : 244-258.

7. LONG, C. N. H., 1924, The lactic acid in the blood of a resting man. *J. Physiol.*, 58 : 455-460.

8. NIMS, L. F., GIBBS, E. L. & LENNOX, W. G., 1942, Arterial and cerebral venous blood ; changes produced by altering arterial carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*, 145 : 189-195

Rev. Brasil. Biol., 4(1):109-112
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

SISTEMA EXCRETOR DE "RENIFER HETEROCOELIUM" (TRAVASSOS, 1921) TRAVASSOS, 1928 (Trematoda, Reniferinae) [1]

ARISTOTERIS T. LEÃO
Instituto Butantan, São Paulo

(Com 2 figuras no texto)

Na presente nota trataremos da descrição pormenorizada do sistema excretor de *Renifer heterocoelium* (Travassos, 1921), trematóide parasito da cavidade bucal e do esôfago das serpentes brasileiras. Temos encontrado êste platelminto parasitando as mais variadas espécies de cobras, peçonhentas ou não, cuja percentagem de infestação vai, geralmente, além de 20% do total de hospedadores que temos examinado.

Serviram de base ao presente estudo cêrca de 20 exemplares retirados da cavidade bucal e do esôfago de *Eudrias bifossatus* (Raddi) (=*Drymobius bifossatus* Raddi), *Colubridae* áglifa muito comum no sul do País, conhecida vulgarmente por "Jararacuçú do brejo".

O sistema excretor do helminto em questão foi decalcado de exemplares vivos, nos quais usamos os mais variados artifícios para evidenciá-lo, porém, sem resultados animadores. O conteudo uterino é o maior impecilho à boa observação dos detalhes dêste aparelho, sendo entretanto, êste inconveniente, facilmente superado se, ao retirarmos os parasitos do hospedador, os colocarmos diretamente em água de torneira, pois imediatamente os vermes iniciam a descarga dos ovos, ficando o útero completamente vazio, o que permite a boa visibilidade dos diversos canalículos e células vibráteis. Êste fato foi observado sem nenhum conhecimento anterior sôbre o assunto. Posteriormente, porém, tivemos conhecimento de um trabalho de Byrd (1935) no qual este autor faz referência a esta ocorrência, não sendo, portanto, nova a nossa observação. O exame da vesícula e dos canais coletores, primários e secundários, deve ser feito logo que o parasito é retirado do hos-

[1] Recebido para publicação a 26 de Fevereiro de 1944.

pedador, porém, os canais coletores terciários, capilares e células vibráteis só se tornam evidentes depois de mais ou menos meia hora de permanência do parasito em água.

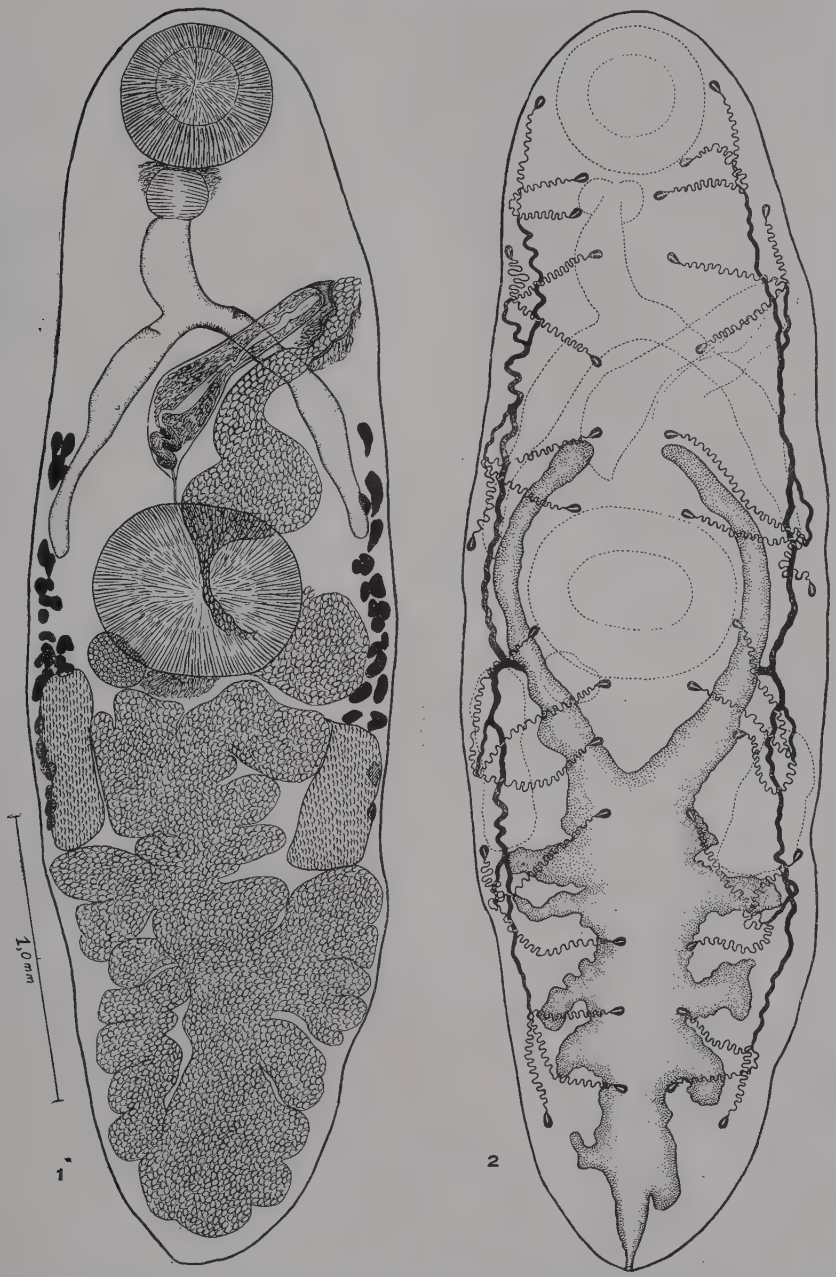
SISTEMA EXCRETOR

Poro excretor : está localizado na extremidade posterior do corpo, ao nível da linha mediana.

Vesícula excretora : em forma de *Y* com o ramo ímpar ocupando quase toda a porção post-ovariana, muito calibrosa, não possuindo uma forma definida, pois é dotada de movimentos contínuos, emitindo projeções laterais em todos os sentidos, o que lhe dá um aspecto característico. A bifurcação se dá na zona testicular, originando-se daí dois ramos que se dirigem para a frente envolvendo e ultrapassando o acetábulo. Nesta parte da vesícula excretora notam-se também movimentos contínuos, porém de menor intensidade do que na parte posterior, não sendo muito proeminente as suas projeções laterais. A vesícula excretora é geralmente bem visivel após o prévio esvaziamento do contúdo uterino, pois esta apresenta forte pigmentação escura.

Troncos coletores primários inseridos lateralmente ao nível da zona ovariana, relativamente curtos, se desdobrando em dois *canais coletores secundários* que se dirigem em sentido contrário : um para a frente, *canal coletor secundário anterior*, e outro para trás, *canal coletor secundário posterior*. Os canais coletores secundários anteriores, situados um em cada margem do corpo, da linha equatorial para cima, emitem a primeira ramificação terciária ao nível da base da bolsa do cirro ; esta ramificação é externa e se dirige para trás, a pequena distância se subdivide em três capilares que terminam em células vibráteis assim distribuídas : as duas anteriores próximas à linha mediana, imediatamente acima do acetábulo e a posterior próxima à margem do corpo, na zona acetabular. O *segundo* e *terceiro ramos terciários anteriores* da bifurcação observada ao nível da zona do esôfago dirigem-se ambos para a frente, o segundo é externo, mais curto, dando origem aos capilares ao nível do poro genital, dando estes origem a uma célula vibrátil lateral (a anterior) e duas medianas. O terceiro *canal coletor terciário anterior* é o mais longo, dêste partindo três capilares ao nível da zona faringeana, cujas células vibráteis se distribuem na região peri-oral, nas margens da ventosa oral e da faringe. Seguindo o trajeto dos *canais coletores secundários posteriores* vamos verificar a primeira ramificação terciária na margem superior da zona testicular. O ramo terciário é externo, dirige-se para trás e, ainda na zona testicular se trifurca em capilares que se dirigem para a parte média, originando-se destas três células vibráteis internas que se localizam entre as zonas acetabular e testicular. Logo abaixo desta última zona verifica-se a bifurcação que dá origem aos dois canais terciários restantes. O segundo canal *coletor terciário posterior* é curto, daí saindo três capilares que por sua vez dão nascimento a outras tantas células vibráteis, sendo duas medianas e uma lateral e externa. Finalmente o terceiro *canal coletor posterior* é, como o terceiro anterior muito mais longo que os outros, dando-se a sua diferenciação em três capilares nas últimas porções do corpo e as células vibráteis, que dêles se originam, guarnecem a região posterior do corpo.

A fórmula do sistema excretor de *Renifer heterocoelium* é, portanto, do tipo 2 (3+3+3) + (3+3+3), concordando, aliás, com a fórmula já descrita para vários membros dos *Reniferinae*.



Renifer heterocoelium (Travassos, 1921) Travassos, 1928 — Fig. 1 : Vista total (lote n.º 5553); fig. 2 : pormenor do sistema excretor, desenho à mão livre feito ao microscópio. Figuras originais.

SUMÁRIO

No presente artigo o autor descreve, minuciosamente, o sistema excretor de *Renifer heterocoelium* (Travassos, 1921) Travassos, 1928. Este estudo foi possível graças à observação demorada de exemplares vivos, adultos. A fórmula do sistema excretor do parasito estudado é do tipo 2 (3+3+3) + (3+3+3), típica dos *Reniferinae*.

SUMMARY

In the present paper the excretory system of *Renifer heterocoelium* (Travassos, 1921) Travassos, 1928 is carefully described. The worm here studied is a common parasite found in the mouth cavity and oesophagus of numerous species of Brazilian snakes. The formula of the excretory system of *Renifer heterocoelium* is of the type 2 (3+3+3) + (3+3+3), characteristic for the *Reniferinae*.

BIBLIOGRAFIA

BYRD, E. E., 1935, Life history studies of *Reniferinae* (Trematoda, Digenea) parasitic in reptilia of the New Orleans area. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 54(3): 196.

TRAVASSOS, L., 1921, Contribuição para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira. XII. Sôbre as espécies brasileiras da sub-família *Brachycoelinae*. *Arq. Esc. Sup. Agr. Med. Veter.*, Niterói, 5: 59.

TRAVASSOS, L., 1928, Fauna helmintológica de Mato Grosso. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 21(2): 309.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):113-122
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

"THRASAËTUS HARPYIA" (L.) [1]

ALIPIO DE MIRANDA - RIBEIRO

(Com 7 figuras no texto)

Thrasaëtus

Gray, 1837, P. Z. S. p. 108.

A morfologia deste robusto rapineiro torna-se notavel pelo tamanho da cabeça cujo bico adunco comprimido e recurvado, tem o culmen transversamente rugoso à proporção que a ave se desenvolve em idade. A ponta curva-se enormemente para baixo da mandíbula que é, assim, forçada a um deslocamento lateral. O cerumen largo, precedido por narina ampla e subverticalmente fendida. Os olhos grandes e sobrepujados por largo sobrecenho rijo, tem direção quase antevertida. As penas da orla da cara formam uma crista circular que parece a aureola das corujas; um cocar, às vezes duplo, de penas erecteis no alto da nuca. O pescoço relativamente longo, tem as penas transversalmente truncadas no extremo livre. As asas têm as rêmiges da mão terminando na mesma curva que as do cúbito; as rêmiges são largas e fortes; as da mão um tanto em forma de faca; as do braço, ao contrário, espatuladas e de extremo redondo.

Dez retrizes iguais a 2/6 do comprimento da asa. Tarsos subtriangulares, revestidos de escamas pequenas nos lados, maiores anterior e posteriormente, bem como nas falanges terminais. Unhas curvas, a do primeiro artelho a mais aberta; a do segundo mais espessa e mais curva. Espécie única:

Thrasaëtus harpyia (L.)

(Uirussú, Gavião Real, Gavião de Penacho, Harpyia)

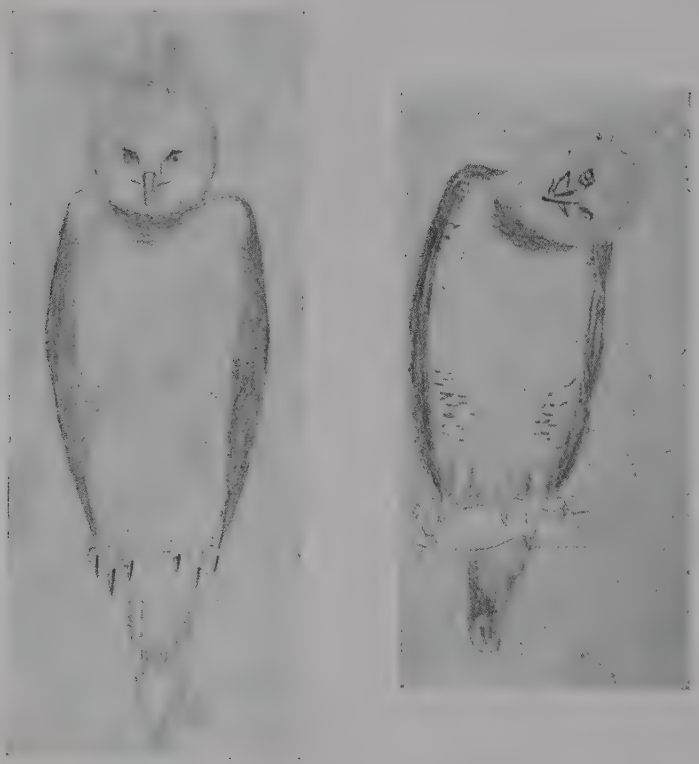
É no lado superior de um cinéreo sepiáceo, quase negro no manto e nas últimas penas do braço, mais claro à proporção que se caminha para a cabeça que é cinérea glauca; as rêmiges são transfaciadas e marmoradas de cinza, denegrido e sépia, sobretudo na barba interna; as retrizes têm cinco tarjas cin-

---

[1] Recebido para publicação a 3 de Março de 1944.
A REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA, em homenagem à memória de um dos maiores zoólogos brasileiros, o professor Alipio de Miranda-Ribeiro, falecido em 3 de janeiro de 1939, no seu posto de naturalista-chefe da Secção de Zoologia do Museu Nacional do Rio de Janeiro, solicitou de seu filho Victor a necessária autorização para fazer publicar este trabalho inédito, que só foi modificado na ortografia, e que está acompanhado de 7 ilustrações feitas à lapis preto e devidas ao Dr. Eladio C. Lima. Apesar da denominação atual da ave estudada ser a de *Harpia harpyia* (L.), o Conselho Científico autorizou a impressão do trabalho sem qualquer modificação de caráter técnico (Nota da Comissão de Redação).

zentas marmoradas de sépia, alternadas com outras tantas negras; e terminam por uma estreita fímbria clara.

Inferiormente é cinzenta mais clara no mento e pescoço; na base deste o negro do manto passa para a frente, formando um colar bastante largo que deixa livre apenas o papo.



Figs. 1-2 — *Thrasaëtus harpyia* (L.).

Todo o resto da parte inferior é branco, com as penas da perna transfaciadas de negro.

As subulares são brancas, irregularmente marmoradas de cinzento e transfaciadas de negro junto a curva; além há uma nódoa negra retinta, constituida por umas três penas dessa côr; e na axila outra nódoa negra se difunde do patágio para trás.

Bico negro; loros e cerumen cinzentos, iris cinzenta e tarso e pés amarelos de cromo claro. Dimensões: Bico, do ricto à curva anterior 85 mm.; asa (da curva à ponta) 630 mm.; cauda 440 mm.; tarso 120 mm.; primeiro artelho 50 mm.; 1.ª garra 65 mm.; 2.º artelho 55 mm.; 2.ª garra 50 mm. Total 106 centímetros.

O macho difere da fêmea tão somente nas dimensões, sendo de porte muito menor: Gonis: 4 cm.; asa: 53 cm. (da curva à ponta da rêmige); total: 83 cm. Tarso: 10 cm.; unha do polex: 8 cm.; unha do index: 7 cm.

Distribuição geográfica: México, América do Sul, Brasil, Chile e Paraguai.

A feição mais característica da "Harpyia" reside no bico, em forma de gancho perfeitamente curvo. Os seus grandes olhos, situados no

Fig. 3 — *Thrasaëtus harpyia* (L.).

fundo de uma região orbitária escavada, precedida de loros quase nús ; e a disposição, em resplendor, das penas da cara ; e o cocar maior que

lhe emerge da nuca, ora em dois faixos de penas direitas, emprestam-lhe uma fisionomia sobremodo feroz e sinistra. Um mixto de águia e de coruja, um tanto desagradavel se bem que imponente. O cocar da nuca é sobremodo movel e quase sempre obliquamente ereto, em posição de repouso. A asa é grande ; as rêmiges primárias pouco maiores que as secundárias e as penas do lado inferior, a não ser as subcaudais que são plumosas.

Fig. 4 — *Thrasaëtus harpyia* (L.).

ESQUELETO

Considerado em conjunto, duas peculiaridades aparecem no esqueleto da "Harpyia": o tamanho da cabeça e a robustez e grossura dos membros posteriores, em relação ao pequeno tamanho do tronco e curteza dos ossos da asa.

Crânio — Norma lateral: O perfil craniano é comparavel com o de *Haliaetus leucocephalus.*[2] Contudo, a linha do perfil superior, pouco oblíqua, é reta pelo desenvolvimento da câmara olfativa e da órbita ocular.

O premaxilar é o mais elevado, dentre todos os ossos nas aves atuais; e por isso a sua secção anterior quase ganha o plano dos nasais, que são curvos e deprimidos posteriormente. Não há processo evidente em sua tomia, não obstante a curva saliente que substitue o dente auxiliar dos falcões.

As fossas nasais são revestidas de um forro ósseo muito tenue, só oferecendo soluções de continuidade irregulares anteriormente e ligado ao seu oposto por trabéculas ósseas que se tornam mais contiguas para trás, onde as duas lâminas se fundem num estreito e reduzido septo internasal. Este quase fica em contacto com o etmóide. O lacrimal emite uma forte expansão supra-ocular e posteriormente um grande suplemento que vai a um sexto da extensão orbitária, como em *Falco.*

Fig. 5 — *Thrasaëtus harpyia* (L.).

A norma craniana superior é perfeitamente idêntica à de *Haliaetus leucocephalus,* com a diferença de serem mais largos e mais se dirigirem para trás os processos supra-orbitais do lacrimal e serem mais largos os frontais; também, o premaxilar é muito mais estreito.

O mandibular tem a epífise articular muito larga, de modo a oferecer grande suporte à articulação do bico.

---

[2] Veja-se Shufeldt, Osteologiyg. of the Accipitres, 62*d* Annual Report of the N.Y.S. Mus. p. 103, fig. 52.

A norma inferior oferece uma forma triangular bem regular. O basiocipital é muito distendido para baixo e o foramen deixa ver perfeitamente a torsão sofrida pelo osso, da sua posição horizontal clinóide para a vertical ortógrada. O quadrado é muito robusto. O comprimento basilar é de 125 mm.; a largura interótica 75 mm.; altura do bico na base 37 mm.; comprimento premaxilar 33 mm.

Vértebras cervicais : Caracteristicamente longo, o pescoço com as suas onze vértebras com as hemapófises e apófise transversas superiores grandemente desenvolvidas e retrovertidas. O atlas é especialmente robusto, embora pequeno, tendo as cristas espinhosas das apófises medianas superiores e inferiores alongadas e compridas. O foramen da artéria vertebral é de direção látero-anterior. O do axis, ao contrário, é súpero-posterior. *Torácicas* : As duas primeiras têm costelas rudimentares e subcilíndricas. Das outras sete só a primeira exibe costela simples sem apófise recurrente.

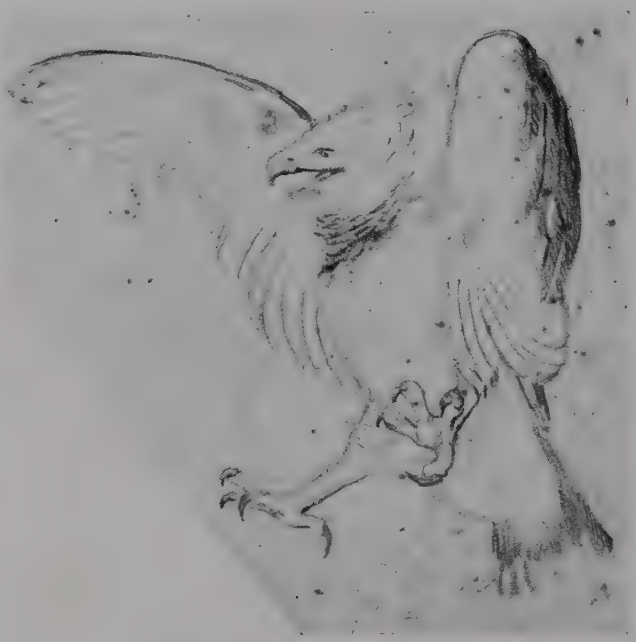


Fig. 6 — *Thrasaëtus harpyia* (L.).

As posteriores são muito grandes, com o centro espesso e uma crista dorsal elevada ; o seu diâmetro total é o quádruplo do diâmetro do atlas, donde se pode considerar o quanto sejam espessas e fortes. A bacia envolve as vértebras *lombares*. As vértebras coccigeanas são em número de sete, sem contar o pigóstilo. Elas começam estreitas e depois alargam as suas apófises transversais para se retrairem depois nessa lâmina vertical e de base dilatada com a aparência perfeita da relha do arado — o pigóstilo.

Costelas : As apófises recurrentes são largas, lamelares e de inclinação póstero-superior. A sua base é muito larga e bifurcada, formando com a articulação posterior uma disposição lamelar de corte em T que se torna muito notavel pela robustez. As cartilagens esternais são ossificadas e espessas no ex-

tremo esternal. O extremo oposto oferece o maior diâmetro em ângulo quase reto com o outro.

O *esterno* tem quase a feição do de *Polyborus*, com a soldagem do extremo posterior que deixa dois foramens elipsóidais mais longos do que largos; daí ter o conjunto e o perfil do esterno do falcão comum, e mais acentuado do que em *Psittacus*.

Esse osso é sobretudo notavel pela espessura e pelas articulações das cartilagens esternais; e emite um processo látero-esterno por fora do ângulo póstero-lateral e de direção látero-anterior. Nos movimentos respiratórios esse processo ampara pelo lado de fora, o último esternal.

O *coracóide* é duma robustez e tamanho notáveis. O seu extremo esternal é largo, vomerino e emite um processo de direção externo-lateral bem saliente. O seu lado interno coalesce perfeitamente com o seu oposto deixando de permeio, em saliência, um pequeno processo do esterno de direção anterior.

A *fúrcula* é curva, lamelar e muito forte; articula-se externa e anteriormente sôbre o coracóide e posteriormente sôbre a clavícula. O seu processo posterior é reduzido para receber o ligamento que prende ao processo esternal mediano. O seu perfil faz lembrar um "boomerang".

Fig. 7 — *Thrasaëtus harpyia* (L.).

Solidamente encostada ao caracóide a *clavícula* repousa sôbre o processo interno que se eleva da crista interna daquele osso, se estende como largo e sinuoso húmero.

Húmero — Dir-se-ia uma grande colher emborcada. O seu extremo anterior é triedral, fortemente carenado no lado dorsal e escavado no axilar. A sua extremidade posterior, larga e robusta, recebe o delgado rádio por dentro e o cúbitus no bordo da sua face articular. Pode-se dizer que esta articulação é em trifólio.

O *rádio* é muito delgado e quase reto, de secção subtriangular ; a sua articulação anterior é bífida.

O *cúbitus*, ao contrário, robusto, subcilíndrico e curvo, deixa ver, aos pares, 18 a 19 inserções das grandes rêmiges.

O *escafóide* apanha o rádio pela face póstero-interna e o cúbitus pelo posterior ; o piramidal e o pisiforme soldados oferecem a superfície de rotação dos dois metacarpos internos que, soldando-se no extremo posterior, dão base a três falanges atrofiadas.

O *polex* iguala 1/3 do metacarpo a que está soldado e fundido o seu curto e lamelar carpal. Igualmente o "index" quase reto e piramidal, oferece uma ligeira dilatação vomeróide, imperceptivelmente crenulada, como se desse inserção a uma unha.

Pelvis — O pelvis é apenas mais alongado que o de *Aquila fulva*. [3]

O ileon vem da sétima vértebra dorsal, estreitamente soldado ao seu oposto e formando uma carena dupla, cujas cristas divergem posteriormente para a cavidade cotilóide, onde caem abruptamente para baixo.

Os *foramens obturatorium* e *ischiadicum* são francamente laterais, sem crista intermediária muito forte.

A faceta é reduzida em proporção e o post-pubis não é perfeitamente soldado à sua metade anterior.

O *femur* igualmente em comprimento ao íleon tem o côndilo articular externo fundamente entalhado para a articulação do perônio, como é característico das aves. Rótula em tetraedro quase regular.

Tíbia longa, 1/4 de sua extensão maior que o femur ; é grandemente achatada em todo o comprimento. Por um processo lateral solda-se ao perônio na metade superior e, no extremo deste, o espaço inter-condilóide tem a ponta ligamentosa larga e perfeitamente ossificada no exemplar examinado, para a passagem do tendão do tibial anterior.

O *tarso* é a parte mais característica de todo o esqueleto ; achatado, lamelar, é, na verdade, uma goteira óssea ao longo da qual passam os tendões flexores e distensores dos artelhos, do comprimento aproximado do fêmur e largura igual a quase 1/3 do seu comprimento ; oferece protuberâncias na face superior do terço superior para inserção dos tendões dos músculos tibiais e um foramen intercondilar na base do côndilo externo.

Artelhos — Os flexores principais dos artelhos passam em feixe na goteira constituida pelo metatarsal interno, sôbre que se articula a vigorosa falange do extraordinário polegar ; no exemplar estudado mede 25 mm. de largura, 35 de comprimento.

O metatarsiano respectivo, embora movel, encaixado em toda a extensão dos dois primeiros terços do bordo ântero-externo, sôbre o tarso, e medindo 25 x 30 nos maiores diâmetros, enquanto a falciforme e acerada garra vai a 60 mm. no comprimento maior.

A falangeta em repouso fica no mesmo plano que a falange ; e o processo extensor da unha permite uma rotação de quase 50 graus à garra.

O segundo artelho é grande, justamente notavel por trazer a garra que age combinadamente com a posterior ; tem um desenvolvimento muito maior que os demais (III e IV) e suporta uma garra espessa, cuja ação deve ser quase tão formidavel como a do 1.º. O comprimento da garra é de 5 cm. no exemplar examinado.

---

[3] Vide Gadow — Aves, II Taf. XVII.

O jovem da "Harpyia" foi descrito pelo Brigadeiro Leopoldo Cesar Burlamaque, quando diretor do Museu (*Palestra Scientifica,* I vol., 1858).

É, diz ele, todo branco exceto nas extremidades das grandes penas, onde tem duas, três ou quatro tarjas amareladas. Deve haver engano aquí, cinzenta deve ser a côr de então. Segundo a estampa dada por Emilio Goeldi, com um desenho de Llose, e um exemplar vivo que pude ver na Alfândega do Rio e procedente do aldeiamento dos Arikemes, a côr do manto, das asas e da cauda é cinzenta transfaciada de mais escuro. O resto da plumagem é branca. Os pés amarelos. Talvez seja essa uma segunda plumagem. Sôbre os costumes da "Harpyia" em cativeiro, muito se lê, referido pelo Brigadeiro Burlamaque; ele transcreve um fato observado pelo naturalista francês F. de Castelnau junto às tribus Sepibos do Ucayale, onde um pequeno índio de seu séquito foi atacado por uma "Harpyia" criada em cativeiro que Castelnau comprara aos índios. Isso tem confirmação na referência feita mais adiante, de fato idêntico, observado pelo General Rondon no aldeiamento dos Arikemes.

À página 47 daquela revista, conta o Brigadeiro Burlamaque o que se deu com o exemplar dessas aves que viveu no antigo edifício do Museu, de seu tempo (do Campo de Sant'Anna, em 1858):

> "A sua ferocidade natural não tem soffrido a mais ligeira modificação, apezar de estar presa ha mais de quatro annos, e de ver e ser tratada sempre pelos mesmos individuos. Nos dias d'exposição publica fica quasi sempre furiosa, e avança para os espectadores, procurando feril-os; o que já conseguiu uma vez, lançando as garras á cara de um allemão que teve a imprudência de chegar-se mui perto da gaiola. Se não fosse soccorrido a tempo, o mal seria mui grave, pois que o *Falco destructor* havia-lhe fincado duas de suas enormes unhas, uma no pescoço e outra por baixo do olho esquerdo. Anteriormente um dos serventes, encarregado da limpeza da gaiola, tendo-se descuidado, foi gravemente ferido em um hombro. Finalmente, muitos dos visitantes do Museu, aos domingos, se tem certamente arrependido de o excitar, empregando os seus chapéos de sol e bengalas, porque tem perdido os cabos e os castões, que elle arranca e atira a grande distancia."

O Sr. C. A. Lloyd referido por Chub & Mc-Connel, dizem os índios informaram-lhe que os ninhos contêm dois filhotes; sendo de supor, por isso, seja esse o número de ovos.

A alimentação principal da "Harpyia", segundo a mesma citação, é de *Mycetes seniculus* e sobretudo da Preguiça, que é uma sua vítima frequente. Entretanto, pelo exemplar que eu observei vivo no Museu, e pelas referências aquí feitas, parece que as suas vítimas são os mamíferos e aves quaisquer que ela possa apanhar a seu alcance. Meu filho Carlos, quando em excursão a Paraopeba, Minas Gerais, observou um

exemplar erradio naquelas paragens. Diz ser o seu vôo compassado e lento, com os grandes círculos das aves do grupo e raras pancadas de asa, essas mesmas como que preguiçosas e pouco amplas.

Os índios Arikemes têm por hábito criarem os filhotes das "Harpyias" que são conservados em gaiolas especiais e transportados quando a tribu se resolva a mudar de acampamento ou aldeia.

Referiu-me o General Rondon ter vindo a saber que, num desses transportes efetuados durante a sua permanência na região desses índios, uma criança indígena, chegando demasiado perto de uma dessas aves cativas, fora por ela atacada, e só se salvando pelo socorro imediato dos índios que mataram a águia em vingança dos ferimentos produzidos na criança.

A "Harpyia" em cativeiro mantem-se em repouso durante a maior parte do dia, emitindo, às vezes, um grito estridente e agudo, pouco proporcionado ao volume de seu corpo. Os estudos do vivo feitos por minha ordem pelo Dr. Eladio C. Lima, e aquí reproduzidos, dão melhor impressão das várias poses dessa imponente ave.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):123-124
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

ON THE USE OF A MULTIVIBRATOR AS A GEIGER MULLER COUNTER EXTERNAL QUENCHING CIRCUIT [1]

C. CHAGAS, J. MOURA GONÇALVES and A. L. MACHADO
Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, D. F.

(With 1 text-figure)

In the experiments with radioisotopes performed at the Biophysics Laboratory, we have used a hydrogen filled Geiger Muller counter, manufactured by BALE (1) and granted to us by prof. C. P. LEBLOND.

The counting was done on the usual way (1,2), two ml. of the sample being placed in close contact with the counter.

A special feature of our experimental arrangement was the use of a multivibrator circuit as an external quenching circuit. This circuit was designed by SOUSA SANTOS (3,4) and has several advantages. Its performance with the hydrogen counter has been extremely satisfactory.

The circuit is shown in the diagram (fig. 1). It has a recovery time of the order of 10^{-5} seg.

With this multivibrator we have worked with a plateau of 120 volts, against the 30 volts' plateau described by BALE (1).

The power supply used was a pentode neon-lamp stabilized unit and the counter was connected to the high tension terminal, through a dry battery set. At the beginning of any measurement the starting point of the counting was adapted by means of the powers unit's potentiometer, and a constant voltage raise in accordance with the plateau graph was added.

We think that the use of this method should be of great advantage to biological workers.

Our equipment was built at the department of Physics, University of São Paulo.

---

[1] Received for publication March 9, 1944.

We wish to acknowledge our thanks to Prof. M. D. Sousa Santos, and Prof. G. Wataghin from the Department of Physics, University of São Paulo, and Prof. G. P. Occhialini, at present in our Department, for their help in this work.

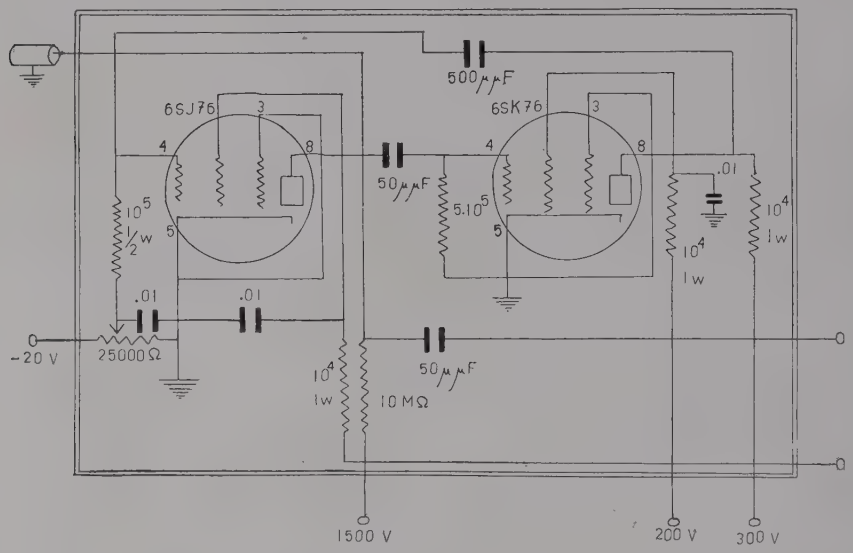


Fig. 1 — Diagram of the circuit described.

SUMÁRIO

Nesta nota os autores assinalaram as vantagens do emprêgo do circuito de multivibração criado por M. D. Sousa Santos (3,4), como circuito de extinção externa da descarga de um contador de Geiger Muller. Nas experiências em curso no laboratório de Biofísica, tem sido usado um contador de Geiger Muller tipo Bale, cujo patamar tornou-se da ordem de 120 volts.

O emprego do multivibrador garante uma contagem acurada de partículas. Os autores descrevem a técnica experimental de contagens que estão empregando.

BIBLIOGRAPHY

1. BALE, W. F., HAVEN, F. L. & LE FEVRE, M. L., 1939, Apparatus for the rapid determination of β-ray activity in solutions. *Rev. Sci. Instrum.*, 10 : 193.

2. BALE, W. F., 1940, Use of artificially produced radio-active elements as tagged atoms in biological research. *Radiology*, 35 : 184-191.

3. SOUSA SANTOS, M. D., 1940, A multivibrator counter circuit. *An. Acad. Brasil. Sci.*, 12(3) : 179-189.

4. SOUSA SANTOS, M. D., 1943, cit. by W. B. Lewis, *Electrical Counting*, Cambridge Univ. Press.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):125-130
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

DETERMINATION OF THE COEFFICIENT OF ABSORPTION OF LIGHT IN THE CELLS [1]

J. MOURA GONÇALVES
Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, D. F.

(With 5 text-figures)

Spectrophotometrical measurements in cells and turbid solutions meet with experimental difficulties which make the application of the spectrophotometrical method rather difficult because of the simultaneousness of absorption and diffusion.

In thin layer, as recently shown by R. WURMSER (1), where the diming of light as a function of the thickness does not follow an exponential law but obeys an equation determined by LANGEVIN (2), the coefficient of absorption and diffusion can be measured in absorbent turbid media.

In order to check experimentally the principles of this method, we have used a technic suitable to allow exact determinations.

METHODS

1) *Diffusing layer* — A thin simple diffusing layer was obtained with sheets of white airmail paper cut in pieces, dipped into liquid vaseline and pressed against each other between two glass plates. These paper sheets had first been placed in distilled water, extended on glass plates, and then dried at 37° C.

The experimental device consists of a source of radiation, a Leitz monochromator and photoelectric resistance cell (Weston), combined with a Leeds-Northrop galvanometer.

The diffusing layer was placed against the cell in order to collect all the diffused light, and the measurements were performed with a wave lenght of 6400 Å with a $\triangle \lambda = 1.10$ mμ. Precautions were taken to maintain constant the intensity of the light during each experiment.

---

[1] Received for publication, March 9, 1944.
This work was made possible by a grant from Mr. GUILHERME GUINLE.

The results are summarized in table I, where L is the number of paper sheets, I_o the galvanometer reading for incident light, I_1 the galvanometer reading for transmitted light.

TABLE I

L	I_o	I_1	I_o/I_1
1	24	22	1,09
2	24	21	1,14
3	24	19	1,26
4	24	18	1,33
5	24	17	1,40
6	24	16	1,50
7	23	14,5	1,58
8	23	14	1,64
9	23	13	1,76
10	23	12,5	1,84
11	23	12	1,92
12	23	11,5	2,0
13	23	11	2,09
14	23	10,5	2,19

The ratio I_o/I_1 plotted against thickness is a straight line (fig. 1) whose equation is

$$\frac{I_o}{I_1} = 1 + K'\frac{1}{2}$$

2) *Diffusing and absorbing layer* — The layer of variable thickness was made in a similar way as the preceding, except that blue colored paper was used.

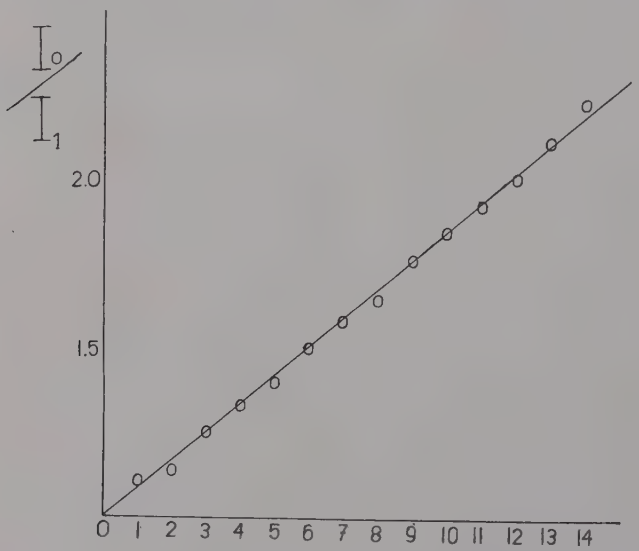


Fig. 1 — Graphic based on Table I.

Papers sheets of uniform thickness were selected and dyed for ten minutes in a 0.7 mg. per 100 ml. methylen blue solution, this time being enough to obtain complete saturation. They were dried as described above and a second check was made after that time.

Table II shows the opacity measurements.

TABLE II

L	I_o	I_1	I_o/I_1
1	29,5	26,5	1,11
2	29,5	24,0	1,23
3	29,5	21,5	1,37
4	29,0	19,2	1,51
5	29,0	17,0	1,70
6	29,0	15,8	1,83
7	28	13,5	2,07
8	28	12,5	2,24
9	28	11,2	2,50
10	28	10,2	2,74

We calculated the opacity values according to the Langevin's law :

$$\frac{I_o}{I_1} = \cosh 1 \sqrt{K(K + K')} + \frac{2K + K'}{2\sqrt{K(K + K')}} \times \sinh 1 \sqrt{K(K + K')}$$

We made in this formula $K = 0.035$, and $K' = 0.17$, and the results are given in table III.

TABLE III

L	I_o/I_1
1	1,12
2	1,25
3	1,38
4	1,54
5	1,70
6	1,87
7	2,06
8	2,26
9	2,48
10	2,73

TABLE IV

L	I_o/I_1
1	1,12
2	1,27
3	1,43
4	1,61
5	1,82
6	2,05
7	2,31
8	2,61
9	2,94
10	3,32

We also calculated the opacity values according to the exponential law and the results are given in table IV.

The agreement between the values calculated from the Langevin's law and our results is evident. The fig. 2 emphasizes this point.

Acording to our observations, 10 sheets represent the limit for the obedience to the theoretical relation.

As an example of the application of the method of Wurmser we present a nomogram (fig. 3), which allows the determination of the coefficients of absorption and of diffusion in the described above. The degrees of thickness chosen were $L_1 = 5$ and $L_2 = 10$. N_1 and N_2 are the logarithms for the opacities in layers 1 and 2, respectively.

APPLICATION OF THE METHOD TO A SUSPENSION OF CELLS

In order to apply the method to cell suspensions we adapt an ordinary microscope to the colorimetrical type of an absorption cell. This device enable us to determine the quantity of light carried through very thin layers.

The fixed part of the absorption cell lays on the active surface of the photoelectric cell placed on the microscope plate. The moving part is attached to

the microscopic tube stripped from the optical parts. The thickness of the layers was directly read by the number of divisions on the micrometric screw (fig. 4).

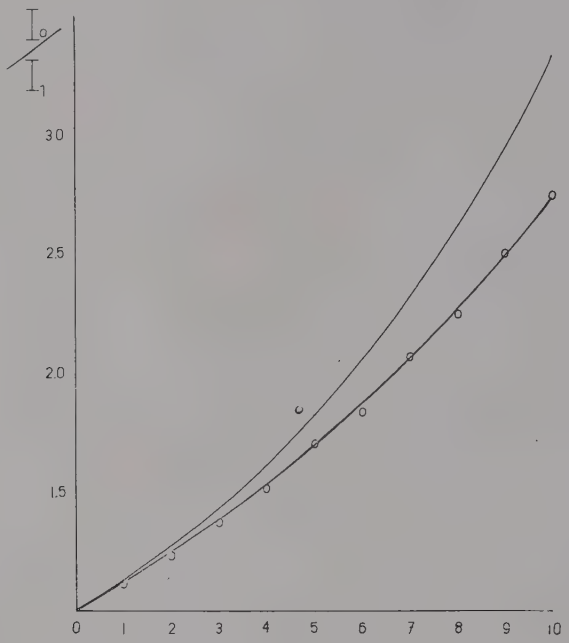


Fig. 2 — Graphic based on Table IV.

We made a number of experiments with a suspension of yeast in isotonic solution containing 6.725.000 cell per cubic millimeter.

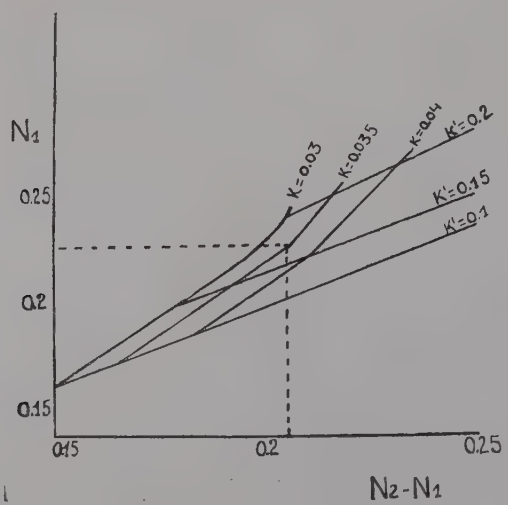


Fig. 3 — Nomogram demonstrating the application of the method of Wurmser.

We were forced by experimental difficulties to begin our measurements at a level where some diffusion was already present.

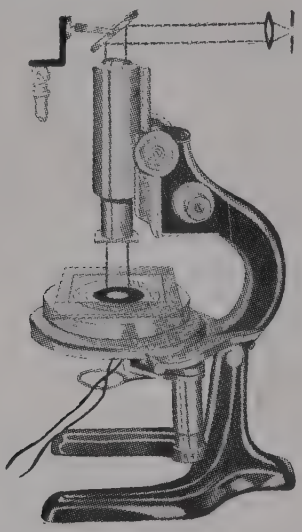


Fig. 4 — Schematic aspect of the spectrophotometric micro-cell.

Table V sums up the results of the experiments made with yeast suspensions (fig. 5).

TABLE V

Micrometer's turns	I_o	I_1	I_o/I_1
0	27	13	2,07
1	27	12	2,25
2	27	11	2,45
3	27	10	2,70
4	27	9,5	2,84
5	27	8,8	3,17
6	27	8,0	3,37
7	27	7,5	3,6
8	27	7,0	3,85
9	27	6,5	4,15

It is a great pleasure to thank Prof. René Wurmser for his interest and kind advices.

SUMMARY

It results from this paper that it is possible to determine directly the coefficients of diffusion and of absorption in turbid media by measuring, for two different layers, the opacity, i.e., the relation I_o/I_1 from the incident light to the transmitted light.

The method is based on a theoretically established law which involves certain simplifications. Consequently, it is necessary, when applying it, to ascertain obedience of the experimental conditions to the theoretical relationship, as we actually did.

The experiments with a suspension of yeast cells shows at once that the referred method may be useful in a quantitative study of intracellular pigments.

We hope that the present paper will become a useful contribution for obtaining new data on the structure of pigments and for the study of the reactions in which they are involved.

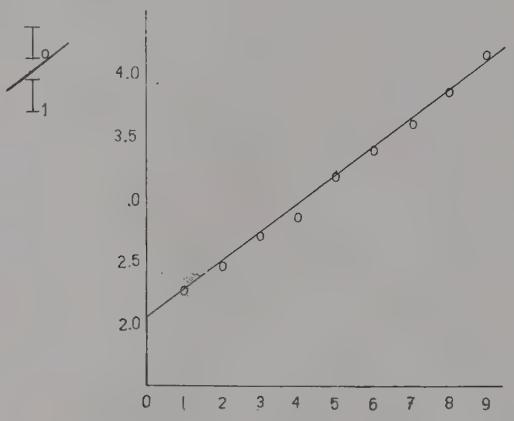


Fig.5 — Graphic based on Table V.

RESUMO

Conclue-se deste trabalho que é possivel determinar diretamente os coeficientes de difusão e absorção em meios turvos, medindo-se para duas espessuras diferentes a opacidade, isto é, a relação I_0/I_1 da luz incidente para a luz transmitida.

O método baseia-se em uma lei estabelecida teoricamente, lei esta que implica certas simplificações. Será necessário, portanto, na sua aplicação assegurar a obediência das condições de experiência à relação teórica como o fizemos.

A experiência com uma suspensão de células de levedo mostra, desde já, que o referido método poderá servir a um estudo quantitativo dos pigmentos intracelulares.

A contribuição que trazemos com o presente trabalho se tornará util na obtenção de novos dados relativos à estrutura dos pigmentos, e no estudo das reações em que tomam parte.

BIBLIOGRAPHY

MOURA GONCALVES, J., 1942, *Absorção e difusão da luz nas células*. Tese. Rio de Janeiro.

WURMSER, R., 1941, Détermination du coéfficient d'absorption des pigments dans les cellules. *Rev. Brasil. Biol.*, 1(3): 325-327.

Rev. Brasil. Biol., 4(1):131-137
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

AMOENITATES BIOLOGICAE

INSTITUTO DE HIGIENE, DE ASSUNÇÃO DO PARAGUAI

HERMAN LENT
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D. F.

(Com 6 figuras no texto)

O atual "Instituto de Higiene del Ministerio de Salud Pública y Previsión Social" teve origem idêntica à do Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, pois foi pensamento dos dirigentes da República do Paraguai erigí-lo quando, nos primeiros meses de 1899, Assunção se viu ameaçada por uma epidemia de peste bubônica oriunda do Rio da Prata, aonde chegara com o navio "Zeier", que teve cargas encaminhadas ao vapor "Centauro" da linha Montevidéu-Assunção.

Fig. 1 — MIGUEL ELMASSIAN, fundador do Instituto de Higiene e seu primeiro diretor. Cliché publicado por gentileza do Dr. ANDRÉS BARBERO.

Constatada a enfermidade contagiosa na "Oficina Químico-bacteriológica Municipal" pelo Dr. JUAN DANIEL ANISITS e seus ajudantes, o Governo de Don EMILIO ACEVAL, presidente de então, solicitou a seu ministro em Paris, Don EUSEBIO MACHAIN, que contratasse um técnico para organizar um Instituto Bacteriológico, técnico esse designado por EMILIO ROUX, diretor do Instituto Pasteur. O Dr. MIGUEL ELMASSIAN, em 10 de abril de 1900, firmava, então, contrato com o

Governo paraguaio para realizar investigações bacteriológicas em geral, preparação de sôro anti-pestoso e estudos sôbre doenças do gado. Este contrato, devo realçar este fato bem expressivo, assinado no princípio do século, já tem características importantes e dignas de meditação ainda hoje, pois encerrava a obrigação, por parte do Governo paraguaio, de criar, de acordo com as indicações do bacteriólogo, um laboratório destinado a investigações e podendo converter-se em centro de ensino, fixando, ao mesmo tempo, que o bacteriologista contratante entender-se-ia diretamente com o ministro.

2

3

Fig. 2 — Luis E. Migone, primeiro diretor de nacionalidade paraguaia do Instituto de Higiene. Fig. 3 — Juan B. Rivarola, atual diretor do Instituto de Higiene.

Elmassian era nascido na capital da Armênia e estudou em Constantinopla onde se diplomou em medicina. Foi obrigado a fugir para França por motivos políticos e, em Paris, ingressou em 1893 no Instituto Pasteur, levado pelas mãos de Maurice Nicolle, tendo sido, depois de 4 anos, nomeado preparador do próprio Instituto. Enviado a Assunção poude fundar e dirigir o chamado "Instituto Nacional de Bacteriologia", tendo ocupado, ainda, a cátedra da Faculdade de Medicina, onde lecionou Bacteriologia, Histologia normal e Anatomia geral (?).

Era homem pouco expansivo e de sua vida não existem grandes documentos que possam servir de base à melhor estudo. Os livros documentários e arquivos do primitivo Instituto foram queimados por inadvertência de um ajudante e os arquivos das administrações posteriores eram, habitualmente, propriedade de seus diretores que os mantinham em suas residências.

Através uma série bem grande de vicissitudes, comuns aliás na vida das instituições científicas sul-americanas, o primitivo Laboratório Bacteriológico do ano de 1900, que tivera como precursor o "Serviço de Vacunación Antivariólica" dirigido pelo Dr. David Lofruscio, passou a chamar-se "Instituto Nacional de Bacteriologia", em 1904 ; "Instituto Nacional de Microbiologia", em 1917 (quando o Dr. Andres Barbero dirigia o Departamento de Higiene) ; "Instituto Nacional

de Parasitologia", em 1927, sendo dependência do Departamento de Higiene; até que, em 1937, passou à denominação de "Laboratórios del Ministerio de Salud Pública" e, em 1942, foi crismado com o nome que agora mantém, o de "Instituto de Higiene del Ministerio de Salud Pública y Previsión Social" dependendo diretamente do respectivo Ministro de Estado.

Sempre funcionando em prédios adaptados, a princípio em 14 de Julio (hoje Mariscal Estigarribia) y Tacuarí (de 1900 a 1932), depois em Tacumbú, Calle Yegros y Ultima Proyectada, na séde do antigo "Cuartel Escuelta Presidencial" (de 1932 a 1936), permaneceu de 1936 a 1937, em edifício situado no Parque Caballero, onde hoje se encontra instalado um museu histórico, e de 1937 em diante no grande terreno de Carlos A. Lopez y Lisboa, onde agora estão construidos seus modernos e claros laboratórios, ainda incompletos.

Fig. 4 — Aspecto do pavilhão central do Instituto de Higiene.

Depois de Elmassian, seu fundador e primeiro diretor, que contou desde logo com a colaboração de Luis E. Migone, Rogelio Urizar e Alberto Schenone, o Instituto de Higiene foi dirigido por Migone, um pesquisador de rara qualidade, ainda hoje, apesar dos anos transcorridos e dos golpes sofridos, um espírito largo e compreensivo a quem o Paraguai deve sua primeira grande projeção nacional no domínio da Patologia tropical. O Prof. Migone foi, então, o 2.º diretor, e por um largo período compreendido entre setembro de 1906 e janeiro de 1927. Coube, em seguida, a Rogelio Urizar prosseguir a tarefa iniciada, auxiliado por Domingo Sanjurjo, Paris E. Menendez e Victor Fracchia e a ele deve ser atribuida a incentivação da produção de uma série de vacinas e, principalmente, o esforço enorme da publicação de uma revista científica, que em seu primeiro volume reeditou todos os trabalhos de Elmassian, os "Anales del Instituto Nacional de Parasitologia", com 5 únicos tomos publicados, de 1928 a 1931.

Domingo Sanjurjo ocupou, por pouco tempo, em 1933, a direção do Instituto e Raul Pena foi, também, seu diretor interino por curto prazo.

Em seguida, coube a Juan B. Rivarola continuar a obra de seus antecessores e conseguir com seu esforço e trabalho eficientes, apoiado pelo atual Ministro, Dr. Gerardo Buongermini, o desenvolvimento e, principalmente, as instalações dos laboratórios que hoje se encontram em funcionamento e que serão ampliados de acordo com as necessidades.

O Instituto de Higiene é um organismo que depende diretamente, como unidade administrativa, do Ministro de Estado, e não está subordinado a nenhuma outra autoridade sanitária. É destinado, principalmente, a servir aos interesses da saude pública e seus laboratórios, que descriminaremos a seguir, orientam suas tarefas para a aplicação utilitária. Isto não impede, contudo, que seu diretor imprima aos trabalhos dos técnicos sob suas ordens uma orientação de pesquisa que só não é mais ampla devido aos recursos materiais reduzidos. Por outro lado, o atual corpo de técnicos do Instituto, com poucas excessões, é constituido de elementos jovens, ainda pouco experimentados, embora com interesse pelo desenvolvimento de seus estudos.

Fig. 5 — Entrada do Instituto de Higiene.

Outro fator que dificulta, em geral, o prosseguimento das pesquisas e a dedicação completa ao trabalho, consiste na redução dos vencimentos que o Estado paga (fenômeno que não é exclusivo do Instituto de Higiene de Assunção) e na falta de auxiliares capazes e concientes de suas obrigações.

O meio local, também, não prestigia, como devia, o seu Instituto de Higiene, principalmente pelo desconhecimento em que se mantém de suas finalidades e, até, de sua existência no estado atual de desenvolvimento e progresso em que se encontra. E isto acontece, até, entre os próprios médicos.

As novas instalações do Instituto de Higiene contam, no momento, com 3 bonitos pavilhões recem-construidos, um deles constituindo o corpo central do edifício e onde estão localizados os principais laboratórios, a biblioteca e sala de conferências e alguns serviços administrativos, como diretoria e secretaria. Um

2.º pavilhão independente, que tem o nome do fundador do Instituto, é constituido de várias dependências e serve exclusivamente para o preparo da vacina anti-variólica. No 3.º pavilhão que é, também, isolado do corpo principal, foi instalado recentemente o Laboratório de Parasitologia e é constituido de 3 salas e um biotério.

Fig. 6 — Vista lateral do pavilhão central do Instituto de Higiene.

A organização dos vários laboratórios é a seguinte :

1) *Laboratório de Análises Clínicas* (com as secções de Sorologia, Microscopia clínica e Química aplicada à clínica) que se destina à realização dos exames solicitados pelas várias repartições governamentais, não somente da Saúde Pública, como do Exército ou de outros Ministérios. Nestas secções são realizados os exames rotineiros de laboratório para confirmação de diagnóstico e o volume de seu trabalho é bem grande.

2) *Laboratório de Bacteriologia* (com as secções de Preparo de meios de cultura, Esterilização e Conservação de amostras bacterianas). Aí são realizados os exames de controle das principais doenças infectuosas, tais como febre tifóide, tuberculose, difteria, disenterias, lepra, doenças venéreas. Existe, também, uma secção antirrábica em desenvolvimento.

3) *Laboratório de Imunologia* (com as secções de Preparo e controle de vacinas e Distribuição de produtos biológicos). Este é serviço extraordinariamente necessário ao país, pois elabora e distribue as vacinas exigidas pelos serviços normais de saude, vacinas distribuidas gratuitamente aos que as solicitam.

4) *Laboratório de Química* (com as secções de Balanças de precisão, Controle de medicamentos, Vitaminas e hormônios e Fotometria e colorimetria). Funciona aos cuidados do Dr. José D. Pecci, que recentemente fez um estágio no Brasil.

5) *Laboratório de Controle Químico e Bacteriológico de água e leite* — Este é um serviço muito importante que funciona, sob a orientação do Dr. Domingo Sanjurjo, com o auxílio do Serviço Cooperativo Interamericano de Saude Pública.

6) *Laboratório de Parasitologia* — Controla as protozooses intestinais, o paludismo, a ancilostomose, leishmaniose e doença de Chagas. Foi, recentemente, desenvolvido e organizado durante a nossa permanência em Assunção em missão da Divisão de Cooperação Intelectual do Ministério das Relações Exteriores do Brasil e do Instituto Oswaldo Cruz. Nele continuam a trabalhar os Drs. J. F. Teixeira de Freitas (médico), M. Cavalcanti Proença (veterinário) e Mario da Silva Ventel (auxiliar).

7) *Laboratório de Patologia Experimental* — Destina-se à experimentação e investigação científicas e conta com o valioso auxílio do Prof. Gustavo González. Tem realizado trabalhos originais sôbre leishmaniose e doença de Chagas e terá grande desenvolvimento quando ficar concluida a construção de um hospital que está projetado. Funciona anexo a este serviço, uma secção de Anatomia patológica sob os cuidados do Dr. Luis Carlos Máas.

8) *Laboratório de Preparo da Vacina anti-variólica,* dirigido pelo Dr. Vicente Mayor, com sala de inoculação e coleta da polpa vacínica, controle bacteriológico e purificação, boxes para os vitelos, geladeira, estufa, etc.

O Instituto mantém pequenos cursos para enfermeiras visitadoras e assistentes sociais. No ano passado realizou seu primeiro curso para graduados — o Curso intensivo de Parasitologia aplicada à Saude Pública — que tivemos oportunidade de organizar e lecionar. É pensamento atual a realização de um curso mais amplo, nos moldes do existente no Instituto Oswaldo Cruz. Também, durante nossa permanência na capital paraguaia, várias conferências foram realizadas no Instituto de Higiene.

Uma pequena biblioteca, de livros e revistas, muito pobre e deficiente, será, assim o espero, o embrião de biblioteca maior e necessária ao investigador.

O corpo de técnicos do Instituto de Higiene, dirigido por Juan B. Rivarola, é constituido pelos Drs. Domingo Sanjurjo, Vicente Mayor, Gustavo González e Luis Carlos Máas (médicos), José D. Pecci e Guilhermo Ocariz (químicos) e Santiago Reyes e Julio Melian (farmacêuticos). Alguns estudantes e um pequeno grupo de auxiliares técnicos completam o pequeno núcleo, ao qual agora estão reunidos os pesquisadores brasileiros do Instituto Oswaldo Cruz.

Juan B. Rivarola, personificando o entusiasmo pela obra que está realizando aliado à capacidade técnica, com um estágio prolongado em instituições argentinas e, principalmente, em alguns laboratórios brasileiros, mormente os do Instituto Butantan, é o penhor e a segurança do progresso da instituição paraguaia. Domingo Sanjurjo, antigo elemento do Instituto, diplomado em França pelo Instituto Pasteur ; Gustavo González, professor da Faculdade, médico militar e clínico de raro brilho e, principalmente, pesquisador interessado em assuntos de patologia regional, com numerosos trabalhos publicados ; Luis Carlos Máas, anátomopatologista formado na Escola eficiente de Boggino, tendo feito estágio no Brasil e nos Estados Unidos da América, são outros elementos de real valor para o Instituto. Os demais, jovens ainda, especializados em sentidos variados, serão certamente os continuadores das tradições adquiridas pelo Instituto de Higiene.

Todos, no conjunto, são, certamente, polivalentes, acompanhando e colaborando no trabalho de cada um.

O quadro se completa com a apresentação da figura dinâmica e prestigiosa do Ministro de Saude, Dr. Gerardo Buongermini, que tem dado ao Instituto todo o auxílio que merece.

O Instituto de Higiene de Assunção tem acompanhado de perto, neste século, as vicissitudes e as dificuldades da vida da Nação paraguaia, que se refletem naturalmente no seu desenvolvimento ; tem conseguido vencer lentamente, apesar de tudo, e já conhece agora o estímulo que foi muito nosso, porque passamos por idênticas situações, e que lá deixamos gravado durante nossa passagem — a bela frase de Oswaldo Cruz : "Não esmorecer, para não desmerecer".

Rev. Brasil. Biol., 4(1):139-144
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

CRÍTICA BIBLIOGRÁFICA

FISHER, R. A. & YATES, F., 1943, STATISCAL TABLES FOR BIOLOGICAL AGRICULTURAL AND MEDICAL RESEARCH, 98 pp., Oliver and Boyd Ltd., Londres e Edinburgo. *

A estatística é um recurso básico para o biologista, por lhe permitir interpretar devidamente os dados quantitativos oriundos da experimentação ou da simples observação.

A biologia, com seu material, tem, aliás, sido motivo de sucessivo enriquecimento do método estatístico, cujo horizonte se tem alargado com novas concepções e processos, desenvolvidos, entre outros, por R. A. FISHER, grande nome da ciência inglesa.

Em "Statiscal Methods for Research Workers", FISHER apresenta aos pesquisadores biologistas exposição, matematicamente acessivel, de recursos estatísticos a serem utilisados na investigação científica.

"Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research" completam aquele livro, fornecendo táboas mais desenvolvidas que as nele apresentadas.

Os pesquisadores médicos alí encontrarão aplicação preferencial para algumas tabelas.

As tabelas evitam o cálculo dificil e laborioso para determinação dos valores correspondentes a distribuições teóricas.

Nos testes de significância, a probabilidade do desvio encontrado é expressa, na prática, com referência a determinados limiares usuais, que são 0.05 ou 0.01, considerando-se divergência significativa a que exceder o limiar convencionalmente adotado.

As tabelas são, geralmente, discriminadas, fornecendo detalhadamente valores correspondentes a muitos pontos.

As de FISHER & YATES dão não só a curva normal, como outras distribuições, cujo emprêgo se vai fazendo corrente nas pesquisas científicas.

A distribuição de "t", simétrica e tendendo para a normalidade quando cresce o número de graus de liberdade, ligados de certo modo ao número de observações, foi estudada por "Student", tendo FISHER desenvolvido suas aplicações. É utilisavel não só para estudo das grandes amostras, como sobretudo para as pequenas amostras, quando tem a curva normal restrição em suas aplicações.

FISHER deduziu também outra distribuição, a de "z", pela qual se testa a razão das variâncias, vindo a ser metade da diferença dos logarítimos neperianos das estimativas de duas variâncias.

---

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

O coeficiente de correlação (r) não se distribue normalmente nas pequenas amostras, nem mesmo nas grandes quando seu valor é elevado. O teste de significância poderia, assim, se basear na distribuição de "t", mas FISHER forneceu um valor, "z", que é a metade da diferença dos logarítimos neperianos de (1+r) e (1—r), cuja distribuição é aproximadamente normal.

A distribuição de chi quadrado, que é a soma das razões dos quadrados dos desvios entre valor observado e esperado para o esperado, permite testar a hipótese de independência ou associação de valores encontrados, servindo também para testar o ajustamento de determinada curva aplicada aos dados observados.

O livro fornece ainda outras tabelas especiais (probabilidade de acontecimento na curva binomial e na de Poisson, diferença de médias, estimativa do número de germes pelo método de diluição, etc.), afora outras tabelas usuais de matemática.

Achilles Scorzelli Junior

NICOL, H., 1943, THE BIOLOGICAL CONTROL OF INSECTS, 174 pp., 9 figs., 8 pls., **Pelican Books**, London. *

A Editora Penguin Books tem contribuido vastamente para a divulgação da literatura, arte e ciência. A guerra não interrompeu a sua atividade. O presente livro sôbre o controle biológico dos insetos procura informar sôbre um campo da ciência moderna, cuja importância e métodos de trabalho nem sempre são devidamente conhecidos.

"Biological control has been practised by every person who has kept cats on account of the mice...". Existe um caminho longo e dificil desde este método quase subconciente de controle biológico, até as maravilhas atualmente atingidas neste campo.

O entomólogo encarregado de combater uma definida praga, geralmente procura inimigos naturais destes insetos nocivos. Nem sempre são parasitos — larvas de diversos coleópteros, que ameaçaram destruir totalmente a cultura de cana de açucar em Puerto Rico, foram extinguidas pelo sapo *Bufo marinus* L., introduzido de Barbados. Nesta ocasião, muito tempo foi perdido com a tentativa de criar estes sapos em cativeiro — mas depois de terem soltos alguns exemplares, foi constatado uma vasta proliferação da espécie na natureza, e em seguida se estabeleceu o controle completo da praga.

No controle biológico, nem sempre se trata de insetos que tem de ser combatidos. Também plantas podem se tornar pragas, especialmente quando são levadas para países fora da sua distribuição geográfica normal. Alí eles se acham livres de todos os fatores, que na sua terra de origem mantém um equilíbrio biológico. Espécies do gênero *Opuntia* (*Cactaceae*), provenientes das Américas, e introduzidas como plantas ornamentais na África do Sul e na Austrália, alí proliferaram de um modo assustador, chegando a cobrir em 1925 na Austrália 60.000.000 acres, inutilizando estas terras para qualquer uso humano. No decorrer de 17 anos de pesquisas na América Central e do Sul, cerca de 150 insetos que atacam *Opuntia* foram encontrados. Das 16 espécies mandadas para a Austrália, *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera), proveniente da Argentina, conseguiu acabar quase sosinha com a praga, sendo hoje em dia restituidos aos agricultores todos os terrenos perdidos.

O autor dá muitos outros exemplos instrutivos de lutas dificeis e longas, mas que afinal redundaram em sucesso. As dificuldades muitas vezes pareceram

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

quase insuperaveis. Insetos, parasitos comuns de pragas no país de origem, na nova pátria não conseguiram se estabelecer, por razões nem sempre claras. Também aconteceu, que parasitos dos parasitos (hiperparasitos) não permitiram um sucesso.

As dificuldades puramente técnicas pesam gravemente no trabalho. O transporte no mar, a grandes distâncias, exigiram sacrifícios pessoais dos técnicos. A impossibilidade de alimentar os animais durante o longo percurso podem destruir o "stock" de parasitos viventes. Doenças tropicais ameaçam o próprio técnico. HUGH NICOL, aliás, salienta o papel que as condições sociais representam no trabalho científico. "The conditions of social insecurity to which scientific workers are often condemned are not widely realized; and scientific work in general, done to the chance tune of some rich man's legacy or on grants wrung out of an uncompreending administration, is most unscientifically organized". Parece-nos uma das finalidades principais do presente livro, chamar a atenção dos responsaveis para as dificuldades puramente técnicas do atual trabalho científico, e do papel de abnegação muitas vezes representado pelos cientistas.

Afinal queremos mencionar que o autor, membro do "staff" do Imperial Bureau of Soil Science, não é especialista em entomologia. Talvez por isso, tendo uma vista mais ampla dos problemas da Entoomologia Aplicada, resultou este livro muito bem feito de divulgação, que merece ser conhecido em todo o Brasil.

Petr Wygodzinsky

MECHANISM AND CHEMICAL KINETICS OF ORGANIC REACTIONS IN LIQUID SYSTEMS. A GENERAL DISCUSSION HELD BY THE FARADAY SOCIETY, 1941, Surney & Jackson ed., London (Trans. Faraday Soc., 37:601-806). *

A concepção electrônica da valência e, mais recentemente, a mecânica ondulatória deram um novo aspecto a todos os domínios da Química. As comunicações apresentadas à "Faraday Society", em 1941, sôbre o mecanismo das reações orgânicas, são testemunhos desta evolução no que diz respeito ao estudo da reatividade.

Assim, E. D. HUGHES trata a substituição sôbre o átomo de carbono saturado, nos sistemas soluveis. Ele distingue, segundo a classificação habitual, da autoria de INGOLD, os agentes substituintes nucleófilos (que dão seus electrons ou os repartem com um núcleo estranho) e os agentes electrófilos (que adquirem electrons ou repartem os de uma molécula ou de um ion estranhos). As substituições nucleófilas, quer sejam ou não solvolíticas, se fazem segundo um duplo mecanismo. Um primeiro mecanismo pode ser descrito como bimolecular. De acordo com as idéias de LONDON e POLANYI, existe um estado de transição, no qual um par de electrons que não era repartido no reativo, assim se torna parcialmente, enquanto que o par de electrons que ligava o grupo eliminado cessa de ser completamente repartido. O segundo mecanismo começa por uma lenta ionização onde não toma parte o agente substituinte, e que, apesar da intervenção do solvente, pode ser considerada como unimolecular. A ionização é seguida por uma reação rápida entre o ion carbono e o substituinte.

A mesma dualidade de mecanismo se apresenta frequentemente, como estabelecem E. D. HUGHES e C. K. INGOLD, nas reações de eliminação. A substituição nas cadeias laterais aromáticas é estudada por J. W. BAKER, que trata a questão pelo método dos niveis de energia. A alteração da densidade electrônica

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

resultante de uma substituição está em correlação com as mudanças nos niveis de energia da molécula. Pode-se, ao menos qualitativamente, assinalar a um substituinte, de carater polar conhecido, um efeito determinado sôbre a energia de ativação ou a posição de um equilíbrio, considerando a estabilização por ressonância, que o substituinte provoca, seja sôbre o estado inicial, seja sôbre o estado final, seja enfim sôbre o estado de transição do sistema reagente.

E. C. Baugham & M. Polanyi dão uma nova forma da teoria, da autoria deste último, que permite obter o valor da energia de ativação na substituição iônica. Tratando-se, por exemplo, da reação : $I^- + RI = IR + I^-$,
a energia de ativação é a nergia necessária para distender a ligação RI até que ela tenha o comprimento correspondente a um átomo R e um ion I^- em contacto. O raio iônico e a distância inicial RI são deduzidos de experiências sôbre a difração dos electrons. Quanto a energia necessária para distender a ligação RI, ela é obtida por meio da equação de Morse que dá a energia potencial em função da distância que separa os átomos R e I.

Estas poucas indicações são suficientes para mostrar quanto a Física moderna impõe suas tendências à Química. A leitura das 15 memórias reunidas na publicação da "Faraday Society" deixa uma impressão de unidade indiscutivel.

Para terminar, desejamos assinalar particularmente aos bioquímicos, a comunicação de J. Weiss sôbre a reação de Cannizzaro. O mecanismo proposto é baseado, como na teoria de Haber & Willstaetter, sôbre a formação de radicais, mas sem intervenção de longas cadeias. Assim modificada, a teoria está de acordo com todos os dados experimentais até então obtidos.

René Wurmser

DAVSON, H. & DANIELLI, J. F., 1943, THE PERMEABILITY OF NATURAL MEMBRANES Cambridge Univ. Press, X + 361 pp., 72 figs. *

O estudo da permeabilidade e trocas osmôticas tem assumido cada vez maior importância e seu conhecimento e pesquisa conduzem a uma melhor compreensão dos mecanismos íntimos dos processos vitais. O simples fato das membranas vivas apresentarem permeabilidade seletiva, é argumento decisivo em favor da existência de uma estrutura responsavel por este fato, mesmo quando não seja possivel diferenciá-la do protoplasma pelos meios usuais, fornecidos pela técnica microscópica, tal como acontece nas hemátias. Aliás, como frisam os autores, as membranas facilmente diferenciaveis e relativamente espessas, como é o caso da maioria das células vegetais e algumas células animais, tem principalmente função protetora ; as trocas osmóticas, das quais dependem o protoplasma para se manter, são função de membranas muitíssimo mais delgadas, geralmente não diferenciaveis pelos métodos comuns de observação. Não deixa, pois, de ser interessante, considerar que a membrana, cuja existência era discutida e posta em dúvida alguns anos atrás, tem hoje sua existência perfeitamente demonstrada e sua importância primordial justificada pelo importante papel que assume nos processos vitais.

No estudo dos fenômenos de permeabilidade, os trabalhos sucedem-se em grande número, e com o aperfeiçoamento das técnicas de pesquisa, que dia a dia vão se tornando mais complexas, baseadas principalmente em métodos fisico-químicos, cada vez maiores progressos são realizados. Como muito bem acentuou Newton Harvey, no prefácio do volume, nos estudos de permeabilidade dos organismos vivos, os dados experimentais, atualmente, deixaram de ser simples-

* Ofertado pelo Conselho Britânico.

mente qualitativos para assumirem natureza quantitativa. Apesar de terem sido realizados vários "Symposia", dos quais foram publicados alguns volumes, devido ao carater restrito e particular dos assuntos tratados, de há muito se fazia sentir a necessidade de uma monografia como a em questão, em que fossem expostos, de maneira sistematizada, os diversos fatos relacionados com o problema da permeabilidade, no seu estado atual de conhecimentos. Escrito por 2 pesquisadores, que têm trazido muita contribuição nova ao assunto, este livro expõe as diversas questões de maneira clara, talvez um pouco resumida, mas em que todos os pontos de importância são tratados. Tendo cunho essencialmente moderno, de atualização, não deixam, entretanto, de serem referidos os pontos antigos fundamentais. Como é declarado no prefácio dos autores, o objetivo da obra é dar uma visão geral no campo da permeabilidade, afim de permitir boa e real compreensão do assunto, sendo referidas questões de interesse dos estudiosos da medicina, fisiologia, bioquímica, zoologia e botânica. Os assuntos estão distribuidos em 21 capítulos, assim intitulados: 1) Significação dos estudos de permeabilidade; 2) Método de estudo da permeabilidade da membrana; 3) Condições de equilíbrio das células; 4) Algumas equações usadas nos estudos de permeabilidade; 5) A natureza do processo de difusão; 6) A estrutura da membrana plasmática; 7) A interpretação das medidas de permeabilidade; 8) Permeabilidade aos não electrolitos; 9) Permeabilidade aos gases; 10) Permeabilidade a água; 11) Permeabilidade às proteinas e às grandes moléculas lipóides; 12) Permeabilidade dos eritrocitos aos ions; 13) Permeabilidade aos ions por células outras que os eritrocitos; 14) Permeabilidade aos electrolitos fracos e corantes; 15) Impedância e medidas de potencial e permeabilidade; 16) O efeito das substâncias narcóticas sôbre a permeabilidade; 17) O efeito da temperatura sôbre a permeabilidade; 18) Hemólise; 19) Permeabilidade da membrana em relação à secreção; 20) O rim; 21) Teorias da permeabilidade celular.

Os capítulos são escritos por um ou outro autor separadamente, havendo alguns feitos em conjunto. Segundo própria advertência dos autores, os leitores diretamente interessados nas conclusões, podem, sem prejuizo da compreensão geral do volume, omitir a leitura dos capítulos 2, 3 e 4. Destacaremos alguns capítulos como principalmente representativos do volume, como os que tratam dos fenómenos de permeabilidade nos eritrocitos e no rim. Realmente interessantes, são os dados atuais sôbre a constituição das membranas vivas, no seu arranjo íntimo molecular, em que à primitiva concepção da natureza lipóide, foi necessário também admitir a existência de substância de outra natureza, que foi verificada ser uma proteina. São fornecidos dados acerca dos métodos da medida da espessura da membrana dos eritrocitos, que sendo, às vezes, formada por uma camada bimolecular, pode chegar a ter a grandeza de algumas dezenas de Å.

Ao capítulo 16, que muito de perto nos interessa, a propósito da ação das substâncias narcóticas sôbre a permeabilidade, cumpre-nos observar que embora se compreenda o interesse de conhecer a influência de vários narcóticos sôbre eritrocitos ou ovos de *Arbacia*, é muito diferente o registro simples dos resultados obtidos do da generalização dos dados sôbre o modo geral de ação das referidas substâncias nos organismos vivos. É fato elementar que os narcóticos agem, principalmente, sôbre os centros nervosos, e assim acreditamos que os inúmeros resultados contraditórios achados por vários autores para diferentes substâncias narcóticas, sejam sinal evidente que as técnicas acima mencionadas não são indicadas para permitir generalização dos resultados, como se tem procurado fazer para este assunto. Aliás, contra esta tendência Davson é bem ex-

plícito, observando que o material experimental até então realizado, tem sido muito limitado.

Infelizmente, talvez devido às condições decorrentes da atual guerra, esta obra que foi terminada no crítico momento de agosto de 1940, só poude aparecer em 1943. Todos os capítulos terminam com uma lista bibliográfica referente às questões tratadas, e no volume encontram-se muitas figuras, bem como numerosas tabelas com dados numéricos de experiências, muitas das quais dos próprios autores. Tudo isto serve para bem ilustrar a matéria exposta neste livro, cuja leitura é de grande utilidade e interesse para todos os que se dedicam ao estudo dos vários ramos da Biologia.

M. Vianna Dias

DETWILER, S. R., 1943, VERTEBRATE PHOTORECEPTORS. MacMillan Co., New York, 184 pp. 110 figs.

A série de monografias de biologia experimental (Experimental Biology Monographs) que já conta com 7 volumes de grande interesse geral, acaba de se enriquecer com o trabalho de Detwiler sôbre os mecanismos receptores da retina. O interesse pelas questões relacionadas à bioquímica e biofísica da visão tem aumentado ultimamente graças aos estudos da escola de Hecht. A interpretação objetiva dos fenômenos íntimos da percepção, pela aplicação de métodos precisos emprestados à física e à química muito contribuiu para que êsse aspecto da fisiologia tomasse um impulso extraordinário.

O livro de Detwiler se divide em 12 capítulos sendo um de recapitulação. Os cinco primeiros referem-se à parte de anatomia e histologia comparadas da retina, indispensavel para o bom entendimento da fisiologia deste orgão. Nesta parte o autor traz a sua contribuição pessoal aliada a uma revisão bibliográfica escolhida. São de grande interesse os capítulos sôbre a estrutura da retina em relação com a acuidade visual e sôbre os fotopigmentos da retina. Os trabalhos de Hecht e de Wald são resumidos de maneira clara e concisa permitindo ao leitor se por ao corrente das últimas aquisições referentes à vitamina A e a visão no escuro. A questão da deficiência em vitamina A e as modificações histológicas da retina é bastante desenvolvida. Os ciclos de Wald da rodopsina e da porfiropsina e o estado das "gotículas de gordura" de Kolmer são tratados em detalhe. Numerosos gráficos e fotomicrografias, muitas das quais são originais, ilustram o livro.

"Vertebrate Photoreceptors" é uma monografia que se recomenda pela sua clareza e apresentação tanto aos especialistas como aos biologistas.

G. G. Villela

Rev. Brasil. Biol., 4(1):145-150
Abril, 1944 — Rio de Janeiro, D. F.

NOTÍCIAS E COMENTÁRIOS

AUTONOMIA DE UNIVERSIDADES E INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS

Não pode passar despercebido à Revista Brasileira de Biologia o fato de ter o Governo de São Paulo concedido autonomia à Universidade daquele grande Estado Brasileiro que, assim, se torna pioneiro do sentimento generalizado de todos os que vêem na Cultura e na Ciência motivo sério de valor e de progresso.

O movimento generalizado de autonomia universitária que se esboça, do qual São Paulo se constituiu pioneiro, só poderá trazer benefícios ao ensino superior e deverá ampliar-se e interessar também as verdadeiras instituições científicas do país não incluidas em qualquer Universidade.

A exemplo do Instituto Oswaldo Cruz, cujo regulamento atual concede aos chefes de suas várias divisões parte ativa na direção, será necessário ampliar a descentralização por esse modo adotada e permitir a estas instituições, fatores do progresso coletivo, a ampla autonomia administrativa que lhes permita firmar um desenvolvimento que, realmente, já se impôs mais rapidamente no estrangeiro do que no próprio país.

Esta situação, que agora encontra ambiente propício, a Revista Brasileira de Biologia a advoga para os Institutos nacionais de pesquisa pura e aplicada que possuam justas credenciais para tal. Alguns anos atrás, não haveria qualificativo para quem se propusesse a endossar os benefícios da autonomia universitária vitoriosa e constituia séria luta estudantil a campanha, quase vencedora atualmente, pelo ensino gratuito. Os tempos mudam e estas idéias encontram ambiente favoravel e constituem realizações definitivas. Oxalá que a autonomia das instituições científicas se concretize, também, em realidade em tempo bem curto.

REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA

O Conselho Científico, após aprovar o relatório abaixo publicado apresentado pela Comissão de Redação resolveu, elogiando o trabalho de seus membros, re-

novar sua confiança nos esforços dispendidos e no trabalho executado, reelegendo-os para o triênio que agora se inicia. Funcionará como secretário da Comissão de Redação, o Dr. Herman Lent.

Ilmos. Srs. Membros do Conselho Científico da REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA :

Com a publicação do volume 3, a Comissão de Redação completa três anos de exercício e, de acordo com o Regimento da REVISTA, tem findo o seu mandato, que se resumiu na orientação de procurar realizar e manter uma revista científica de nível elevado, concedendo-lhe, tanto quanto possível no momento, uma estabilidade razoavel.

No ano findo viemos a sofrer rude golpe, com o falecimento do Dr. Arthur Neiva, membro do Conselho Científico, de quem a REVISTA sempre mereceu decidido apoio, interesse e entusiasmo.

O volume 3 foi publicado com 510 páginas, encerrando um total de 62 artigos originais (inclusive 3 na secção "Amoenitates Biologicae" e um "In Memoriam"), de 52 autores diferentes. Os assuntos versaram sôbre disciplinas variadas da Biologia e todos os trabalhos entregues à redação, com exceção de 3 recusados pelo Conselho Científico, foram publicados. Dois outros artigos, de autoria dos Srs. Ettore Biocca e Pedro Ferreira-Berrutti, que obtiveram aprovação do Conselho, e cuja matéria já estava composta e paginada, em últimas provas, tiveram sua publicação anulada pela Comissão de Redação, em virtude de termos verificado já terem sido publicados em outras revistas, não constituindo assim matéria inédita. A respeito deste tipo de trabalhos, cujos autores se acham no direito de publicá-los várias vezes, a REVISTA teve ocasião de chamar a atenção de seus colaboradores no último número (vol. 3, n.º 4, p. 501).

95 exemplares da REVISTA foram destinados aos sócios da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro, 39 aos da de Minas Gerais e 77 aos da de São Paulo, que este ano se incorporou em definitivo à Sociedade de Biologia do Brasil. 46 exemplares gratuitos foram enviados às revistas de referência e a instituições da América Latina que solicitaram, assim distribuidas : 9 para os Estados Unidos da América, 9 para a Inglaterra, 7 para o Paraguai, 4 para a Argentina, 3 para o México, 1 para Venezuela, 1 para o Uruguai, 1 para a Colômbia, 1 para o Chile, 7 para Rio de Janeiro, D. F., 3 para São Paulo e 1 para Minas Gerais.

No ano findo foram 58 os assinantes da REVISTA : 36 no Brasil (11 em São Paulo, 14 no Rio de Janeiro, D. F.; 4 no Rio Grande do Sul, 1 no Estado do Rio, 2 em Minas Gerais, 1 no Pará, 2 em Pernambuco e 1 no Ceará) e 22 no estrangeiro (14 nos Estados Unidos, 5 na Argentina, 1 em Hawaii, 1 na Bolívia e 1 na Venezuela).

O movimento financeiro foi relativamente bom e o resumido balancete anexo o demonstra, até 31 de janeiro de 1944 :

RECEITA :	
Saldo do ano anterior	Cr$ 15.880,20
Contribuição do Dr. Guilherme Guinle	36.000,00
Contribuição da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro	4.200,00
Contribuição da Sociedade de Biologia de São Paulo	3.080,00
Contribuição da Sociedade de Biologia de Minas Gerais	1.560,00
Assinaturas e venda avulsa	5.628,00
Separados excedentes	1.870,00
Juros de depósitos no Banco Boavista	930,40
Total da RECEITA	Cr$ 69.148,60
DESPESA :	
Impressão do número 1	Cr$ 9.590,10
Impressão do número 2	8.500,00
Impressão do número 3	6.830,60
Impressão do número 4	8.858,60
Total de acréscimo pago pelos separados excedentes	2.569,30
Material de secretaria, tesouraria, expedição e propaganda	1.520,40
Total da DESPESA	Cr$ 37.869,00
SALDO em 31 de janeiro de 1944 . . . . . Cr$ 31.279,60	
(depositado no Banco Boavista, agência Avenida, conta 21.287).	

É preciso adicionar ao que acima foi exposto que os saldos da REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA no fim dos anos de 1941 e 1942 foram, respectivamente, de Cr$ 4.683,80 e Cr$ 15.880,20, e que as valiosas contribuições do Dr. Guilherme Guinle durante os 3 anos, que foram respectivamente de Cr$ 20.000,00 (1941), Cr$ 28.000,00 (1942) e Cr$ 36.000,00 (1943), equivaleram quase exclusivamente aos gastos feitos somente com a impressão da REVISTA : Cr$ 19.494,80 em 1941, Cr$ 27.648,60 em 1942 e Cr$ 33.779,30 em 1943.

Desta forma, o saldo crescente exibido pela REVISTA nestes 3 anos, proveniente em sua quase totalidade de contribuições de diversas naturezas, independentes da doação de seu patrono, não é mais que forte evidência da maior aceitação que a REVISTA vai tendo, não só nos meios nacionais como nos estrangeiros.

Infelizmente, de outro lado, a situação atual, que vem se agravando de ano para ano, os aumentos sucessivos dos orçamentos para impressão continuaram em proporção elevada, e assim é que para o ano de 1944 subsistirá, como nos anteriores, a majoração de cerca de 35%. Esta situação não pode deixar de ser encarada com atenção, devido aos problemas que pode acarretar para à manutenção da REVISTA. Com o saldo que conseguimos reunir, que representava garantia para qualquer emergência ou constituia base inicial para novos empreendimentos, mal conseguiremos imprimir 3 números. De outro lado, o Dr. Guilherme Guinle soube, uma vez mais, demonstrar de maneira inequívoca seu decidido apoio à REVISTA, pondo à disposição da Comissão de Redação, para o corrente exercício, a importância de Cr$ 50.000,00.

Temos ainda a assinalar que no decorrer do ano de 1943, foram inauguradas duas novas secções — *Amoenitates Biologicae* e *Crítica Bibliográfica* — que tiveram boa aceitação e serviram para ampliar os horizontes da REVISTA, cuja finalidade principal consiste em divulgar e auxiliar as diversas especialidades das disciplinas biológicas. Na primeira são expostos artigos de carater geral ou histórico, relacionados com problemas de cultura; na segunda, são apresentadas críticas e análises de obras científicas.

Como das outras vezes, todos os comprovantes das despesas realizadas, arquivo de correspondência e fichários acham-se à disposição dos Srs. membros do Conselho Científico, a quem submetemos a aprovação de nosso trabalho.

A Comissão de Redação
J. F. Teixeira de Freitas
Herman Lent
Mario Vianna Dias

JOSÉ DE CASTRO TEIXEIRA (1906-1944)

Com o desaparecimento prematuro de José de Castro Teixeira viu-se a Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro desfalcada de um dos seus elementos de maior realce. Perda tanto mais lamentavel quanto sabemos que se tratava de legítimo discípulo da Escola de Oswaldo Cruz, tendo sabido honrá-la, quer pelo rigoroso espírito científico que possuia, quer pela dedicação à pesquisa.

Ao diplomar-se, em 1928, pela Faculdade Nacional de Medicina, já dispunha Castro Teixeira de largos conhecimentos clínicos pois que iniciara o seu aprendizado no decorrer do 3.º ano médico, obedecendo à orientação dos Professores Carlos Chagas e Eurico Villela. Pouco depois, completou o Curso de Aplicação do Instituto Oswaldo Cruz e passou a exercer as suas atividades como médico do atual Hospital Evandro Chagas tornando-se, em pouco tempo, autoridade em medicina tropical.

Quando se criou a cadeira de Doenças Tropicais e Infectuosas na Faculdade Nacional de Medicina e foi ocupá-la o Prof. Carlos Chagas, Castro Teixeira foi um dos assistentes escolhidos por aquele sábio brasileiro, tendo tido ocasião de prestar ao mesmo professor auxílio dos mais relevantes. Durante esse período foi nomeado, após concurso, docente livre da Cadeira.

O Prof. Moreira da Fonseca, que substituiu o Prof. Carlos Chagas empenhou-se na permanência de Castro Teixeira no mesmo cargo, que só veio a deixar quando optou pelas suas funções no Instituto Oswaldo Cruz.

Longa permanência nos Estados Unidos fizeram, do nosso confrade, especialista competente e acatado em virus. De volta, teve ocasião de organizar a Secção de Virus do Instituto Oswaldo Cruz e, depois, de chefiar a Divisão correspondente.

Publicou cerca de cincoenta trabalhos todos relacionados a doenças tropicais ou virus. Na tese de doutoramento estudou o funcionamento renal na anemia pela ancilostomose. Posteriormente, em colaboração com G. G. Villela, dentro do mesmo assunto fez pesquisas sôbre o comportamento do sangue na anemia

helmíntica e proteinas do plasma na ancilostomose e estudos sôbre a nefrose lipóidica.

Durante o último surto de febre amarela no Rio de Janeiro teve oportunidade de estudar o funcionamento renal em amarelentos, assim como durante a convalescença e depois da cura.

Em 1931, iniciou os seus estudos sôbre virus, em colaboração com MAGARINOS TORRES : alterações da epiderme no sarampo e localizações do virus na mesma ; transmissão do alastrim ao *Macacus rhesus* e alterações citoplásmicas nesse animal e no coelho ; inclusões celulares desse virus e do da vacina no macaco assim como relações entre as inclusões de um virus e do outro.

Ainda sôbre o virus do alastrim da varíola, da varicela e do herpes zoster publicou uma série de notas relatando pesquisas originais, inclusive estudos sôbre imunidade, em colaboração com A. MARQUES DA CUNHA e cultivo dos virus em embrião de galinha.

Em 1937, publicou o seu trabalho sôbre patogenia da difteria e, em 1938, Nefrocirrose maligna associada a malformações congênitas em colaboração com MAGARINOS TORRES e Intoxicação pelo veneno de cobra, Necrose simétrica da artéria renal, Uremia, em colaboração com A. PENNA DE AZEVEDO. No mesmo ano, Mielograma na agranulocitose.

A partir de 1940, pouco depois de regressar dos Estados Unidos, publicou uma série de artigos em que encara diferentes virus e métodos para o seu estudo, principalmente os virus da raiva. da cinomose, da gripe, da coriomeningite linfocitária, do linfogranuloma inguinal, do resfriado, do sarampo, da rubéola, do herpes zoster, da varicela e da poliomielite.

Aí está, em rápido resumo, o que foi a vida científica de CASTRO TEIXEIRA. Ao lado dela, e para seu maior prestígio, reunia raras qualidades que o faziam particularmente estimado. É o que posso assegurar aos que menos o conheciam, como seu companheiro que fui, de convívio quase diário, desde os tempos de estudante. Tais eram o seu grande amor à pátria e à família, a boa vontade com que sempre bem servia o próximo, a grande delicadeza de sentimentos e atitudes, a absoluta aversão à rudeza e soluções violentas, bom amigo, ótimo colega.

J. G. Lacôrte

ELADIO CRUZ LIMA (1900-1943)

Em 12 de outubro de 1943 faleceu em Belém do Pará, depois de curta enfermidade, o Dr. ELADIO CRUZ LIMA. Embora não fosse propriamente um profissional das ciências biológicas, pois ocupava lugar de destaque na magistratura paraense, desembargador que era, ELADIO CRUZ LIMA dedicava ao estudo da Zoologia o melhor de seus esforços.

Nascido em Belém, em 1 de Fevereiro de 1900, teve desde cedo despertado seu interesse para a natureza ofuscante que o rodeava. Naturalista na verdadeira acepção, desde cedo devotou especial interesse ao estudo da fauna amazônica, pesquisando com particular cuidado os mamíferos desta vasta região. Vindo ao Rio estudar advocacia, frequentou o Museu Nacional, tendo se acercado de ALIPIO DE MIRANDA-RIBEIRO, em cujo convívio científico esteve por alguns anos, iniciando-se então no estudo da Zoologia. Tinha, além de outras qualidades, grande vigor artístico, desenhando e pintando com excepcional perfeição, o que lhe trouxe inúmeras vantagens nos estudos que realizava, os quais ele mesmo ilustrava. Em alguns trabalhos de MIRANDA-RIBEIRO, como a grande monografia sôbre Ginobatráquios (1926) e no estudo sôbre "Harpyia", que se acha publicado no presente número, encontram-se ilustrações de ELADIO LIMA. Voltando ao Pará, com a reorganização empreendida no Museu Paraense Emilio Goeldi, por CARLOS

ESTEVAM DE OLIVEIRA, ELADIO LIMA deu a este empreendimento colaboração decisiva e desinteresada. Desde então passou a frequentar o Museu, iniciando o trabalho de realizar um catálogo dos mamíferos da região amazônica, onde estudava os animais nas suas características biológicas, acompanhado de ilustrações. Infelizmente só lhe foi possivel terminar a primeira parte do referido trabalho, com o estudo dos macacos da Amazônia. Esta grande obra, cuja impressão teve custo avultado, deve o seu aparecimento, ao alto espírito de compreensão e filantropia do Dr. GUILHERME GUINLE. Ornada de 48 magníficas estampas, com o estudo de mais de 60 espécies de símios, este volume representará contribuição das mais valiosas ao estudo da fauna brasileira.

Ultimamente, quando a morte o veio colher, dedicava-se ao estudo dos morcegos amazônicos, que já estava bem adiantado, ficando assim irremediavelmente interrompido um empreendimento dos mais relevantes.

Dotado de grande delicadeza e elevação de espírito e de maneiras bem simples, infundia ELADIO LIMA grande simpatia pessoal e seu prematuro desaparecimento representa grande perda que a REVISTA BRASILEIRA DE BIOLOGIA, com pezar deplora.

M. Vianna Dias

O Dr. **Herman Lent,** do Instituto Oswaldo Cruz, que esteve recentemente em Assunção do Paraguai, em missão científica sob os auspícios da Divisão de Cooperação Intelectual do Ministério das Relações Exteriores, foi nomeado, por decreto de 23 de Novembro p.p., firmado pelo Presidente Higino Morinigo, Chefe honorário do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Higiene, "como mérito à sua capacidade científica e aos serviços prestados durante o cumprimento da missão de intercâmbio cultural" para que fôra designado pelo Governo brasileiro na República do Paraguai.

A **Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro,** realizou em 30 de dezembro p.p., no edifício do Conselho Municipal, uma sessão comemorativa do seu 20.º aniversário de fundação. Preliminarmente, o presidente Dr. J. G. LACÔRTE falou sôbre a fundação e atividade da Sociedade e, a seguir, usaram da palavra: o Prof. LAURO TRAVASSOS, sôbre "A atuação científica de Arthur Neiva"; o Prof. S. AMERICANO FREIRE, representante da Sociedade de Biologia de Minas Gerais, sôbre "Ação profilática e curativa da sulfadiazina sôbre a malária produzida pelo *P. gallinaceum*"; o Prof. OCTAVIO DE MAGALHÃES, também da Sociedade de Biologia de Minas Gerais, sôbre "Tifo exantemático neotrópico do Brasil — Aspectos epidemiológicos"; e, finalmente, o Dr. ARMANDO TABORDA, representante da Sociedade de Biologia de São Paulo, que dissertou, por mais de 2 horas, com incomum prolixidade, sôbre seus "Estudos sôbre a penicilina".

O Prof. **André Dreyfus,** do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, partiu em princípios de janeiro p.p. para os Estados Unidos da América, onde deverá se demorar cerca de 4 meses. O Prof. DREYFUS, além de um estágio no Departamento de Zoologia da Universidade de Columbia, New York, com o Prof. T. DOBZHANSKY, fará visitas a grande número de universidades norte-americanas, estudando a organização de ensino e pesquisa e realizando conferências.

Reuniu-se no Rio de Janeiro nos dias 17 a 21 de Janeiro de 1944 o **3.º Congresso da Associação Química do Brasil.** Nas sessões científicas foram debatidos numerosos trabalhos relacionados com os diversos ramos da Química (Tecnológica, Agrícola, Industrial, Orgânica, Biológica). A secção de Química Bio-

lógica reuniu-se no dia 21 de Janeiro sob a presidência do Dr. GILBERTO G. VILLELA, sendo secretário o Dr. HENRIQUE TASTALDI, por impedimento do Dr. ARMANDO TABORDA. Foram apresentados os seguintes trabalhos: "Substâncias antibacterianas e penicilina", pelos Drs. A. e L. C. TABORDA e FAVORINO PRADO; "Ácido lático e inibição pelo gás carbônico nas convulsões experimentais do cão", por H. MOUSSATCHÉ & MARIA ISABEL MELLO; "Ação da desnaturação sôbre o potencial de óxido-redução do sistema methemoglobina-hemoglobina", por J. MOURA GONÇALVES; "Vitamina C nas folhas de algumas coníferas", por G. G. VILLELA; "Análise dos carotenóides do plasma humano", por G. G. VILLELA; "Determinação do coeficiente de absorção da luz nas células", por J. MOURA GONÇALVES.

A **Associação Química do Brasil** em cooperação com o **Serviço Técnico da Alimentação Nacional da Coordenação da Mobilização Econômica** promoveu um curso de conferências sôbre vitaminas que se realizou durante os meses de Fevereiro e Março. O programa realizado foi o seguinte: "Vitamina A nos óleos de fígado de peixe", pelo Dr. HUMBERTO T. CARDOSO; "Tiamina, sua preparação industrial", pelo Dr. ITALO V. MATTOSO; "Vitamina D — dificuldade de sua dosagem físico-química", pelo Dr. RUBEM DESCARTES DE PAULA; "Concentrado de vitamina A — aparelhos e técnica", pelo Dr. HUMBERTO T. CARDOSO; "A riboflavina como componente de coenzima", pelo Dr. ITALO MATTOSO; "Biotina — sua importância no metabolismo", pelo Dr. GILBERTO G. VILLELA; e "Vitamina C e sua instabilidade", pelo Dr. OSCAR RIBEIRO.

O Prof. **Miguel Ozorio de Almeida,** do Instituto Oswaldo Cruz, recentemente chegado dos Estados Unidos da América, foi designado sócio fundador da Academia Internacional de Ciências Morais e Políticas.

O Prof. **Henrique Aragão,** em fevereiro p.p., foi efetivado na direção do Instituto Oswaldo Cruz, cargo que vinha ocupando há cerca de 2 anos em carater interino.

O Dr. **J. F. Teixeira de Freitas,** do Instituto Oswaldo Cruz, partiu em 8 de março corrente para Assunção do Paraguai, onde deverá permanecer um ano em missão científica, realizando pesquisas parasitológicas no Instituto de Higiene daquele País. A viagem é realizada por iniciativa da Divisão de Cooperação Intelectual do Ministério das Relações Exteriores do Brasil.

A **Sociedade de Biologia de Minas Gerais** elegeu sua nova Diretoria para 1944, que ficou assim constituida: Presidente — Santiago Americano Freire; vice-presidente — Oscar Versiani; 1.º secretário — José Lopes de Faria; 2.º secretário — Plínio Alves de Morais; tesoureiro — Bernardo F. Magalhães; Conselho Consultivo — Octavio de Magalhães, Aroeira Neves e Nelo Rangel.

A **Sociedade de Biologia de São Paulo** elegeu a seguinte Diretoria para o ano de 1944: Presidente — Odorico Machado de Sousa; vice-presidente — André Dreyfus; secretário geral — Max de Barros Erhart; 1.º secretário — José Leal Prado de Carvalho; 2.º secretário — Luis Augusto Ribeiro do Valle; tesoureiro — João Pereira Junior.

A **Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro** elegeu a seguinte Diretoria para o exercício de 1944: J. G. Lacôrte, presidente; G. G. Villela, vice-presidente; M. Vianna Dias, 1.º secretário; Mario Ferreira dos Santos, 2.º secretário; Cassio Miranda, tesoureiro; Lauro Travasos, Miguel Ozorio de Almeida e H. C. de Souza Araujo, Comissão de Sindicância.